

**Charakterisierung der endosomalen Qb-SNAREs
Vti1a und Vti1b**

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

vorgelegt von
Vera Kreykenbohm
aus Seesen

Göttingen 2004

D7

Referent:

Prof. Dr. Kurt von Figura

Korreferent:

Prof. Dr. Gerhard Gottschalk

Tag der mündlichen Prüfung:

03.11.2004

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Intrazelluläre Transportwege.....</i>	<i>1</i>
1.2	<i>SNARE-Proteine.....</i>	<i>3</i>
1.3	<i>Subzelluläre Lokalisation von SNAREs.....</i>	<i>4</i>
1.4	<i>Strukturelle Eigenschaften von SNARE-Komplexen</i>	<i>6</i>
1.5	<i>Klassifizierung von SNARE-Proteinen.....</i>	<i>8</i>
1.6	<i>Funktion von SNAREs</i>	<i>9</i>
1.7	<i>Vti1</i>	<i>12</i>
1.7.1	<i>Vti1b.....</i>	<i>14</i>
1.7.2	<i>Vti1a</i>	<i>16</i>
1.8	<i>Zielsetzung.....</i>	<i>17</i>
2	Material und Methoden	19
2.1	<i>Material.....</i>	<i>19</i>
2.1.1	<i>Geräte</i>	<i>19</i>
2.1.2	<i>Geräte zur Präparation von Organen</i>	<i>21</i>
2.1.3	<i>Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>21</i>
2.1.4	<i>Chemikalien.....</i>	<i>22</i>
2.1.5	<i>Enzyme und Nukleotide</i>	<i>25</i>
2.1.6	<i>Kits zur Bearbeitung von DNA und Proteinen.....</i>	<i>25</i>
2.1.7	<i>Proteine, Proteinaseinhibitoren und Proteinstandards.....</i>	<i>25</i>
2.1.8	<i>Substrate für das Enzymassay</i>	<i>26</i>
2.1.9	<i>Antikörper</i>	<i>26</i>
2.1.9.1	<i>Primärantikörper.....</i>	<i>26</i>
2.1.9.2	<i>Sekundärantikörper</i>	<i>27</i>
2.1.10	<i>Säulenfüllmaterial</i>	<i>27</i>
2.1.11	<i>Vektoren und DNA-Standards</i>	<i>27</i>
2.1.12	<i>Bakterienstämme und verwendete Zelllinien</i>	<i>28</i>
2.1.12.1	<i>Bakterienstämme</i>	<i>28</i>
2.1.12.2	<i>Zelllinien</i>	<i>28</i>
2.1.13	<i>Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen.....</i>	<i>29</i>
2.1.14	<i>Medien zur Anzucht von prokaryonten Zellen.....</i>	<i>31</i>
2.1.15	<i>Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit eukaryonten Zellen.....</i>	<i>31</i>
2.1.16	<i>EDV</i>	<i>32</i>

2.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	33
2.2.1	Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA	33
2.2.1.1	DNA-Präzipitation mit Ethanol.....	33
2.2.1.2	Extraktion von DNA mit Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol oder Chloroform	33
2.2.1.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	34
2.2.1.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	34
2.2.1.5	Ligation von DNA-Doppelstrang-Fragmenten	35
2.2.2	Isolierung von DNA	36
2.2.2.1	Minipräparation von Plasmid-DNA (Alkalische Lyse).....	36
2.2.2.2	Midi-Präparation von Plasmid-DNA (Qiagen Methode)	38
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	40
2.2.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Qiagen-Methode)..	41
2.2.5	Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA	41
2.2.5.1	Herstellung kompetenter E. coli Zellen.....	41
2.2.5.2	Transformation von E. coli Zellen durch Elektroporation	42
2.2.5.3	Anlegen von Bakteriendauerkulturen.....	42
2.2.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	42
2.2.7	Klonierung von SNAP29 RNAi-Konstrukten und Etablierung von RNAi MEF-Zelllinien.....	45
2.2.8	Sequenzierung	47
2.3	<i>Expression von Proteinen und Gewinnung eines Antiserums</i>	48
2.3.1	Induktion von E. coli mit IPTG.....	48
2.3.2	Lyse durch „french press“ (Zellaufschlussverfahren)	49
2.3.3	Reinigung eines 6HIS-Fusionsproteins	49
2.3.4	Immunisierung der Kaninchen	50
2.3.5	Gewinnung, Aufarbeitung und Lagerung der Seren	51
2.4	<i>Zellbiologische Methoden</i>	52
2.4.1	Trypsinieren von Zellen	52
2.4.2	Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen.....	52
2.4.3	Präparation von Maus-embryonalen Fibroblasten	53
2.5	<i>Biochemische Methoden</i>	54
2.5.1	Proteinbestimmung nach BioRad.....	54
2.5.2	Indirekte Immunfluoreszenz (Permeabilisierung durch Triton).....	54
2.5.3	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	55
2.5.4	TCA-Präzipitation von Proteinen.....	56
2.5.5	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)57	
2.5.6	Western-Blot-Analyse	59
2.5.7	Coomassiefärbung.....	62
2.5.8	Richtungsorientierte Kopplung von Antikörpern an Protein A bzw. Protein G Sepharose.....	62
2.5.9	Isolation von SNARE-Komplexen aus tierischen Geweben.....	63

2.5.9.1	Gewinnung von Synaptosomen aus Hirngewebe	63
2.5.9.2	Isolation von SNARE-Komplexen aus Synaptosomen (Hirn) mittels Immunopräzipitation	64
2.5.10	Herstellung von Zellhomogenat zur Westernblotanalyse.....	65
2.5.11	Gewinnung von Gewebehomogenat und Messung der Aktivität von lysosomalen Enzymen in Geweben.....	65
2.5.12	Endozytose von FITC-Dextran	67
2.5.13	Endozytose von fluoreszent-markiertem LDL	67
2.5.14	Endozytose von Avidin	68
2.5.15	In vitro-Endosomenfusionsassay.....	68
2.5.15.1	Internalisierung von fluid phase-Markern in frühe und späte Endosomen	68
2.5.15.2	Präparation der subzellulären Fraktionen.....	69
2.5.15.3	Zellfreier Fusionsassay.....	70
3	Ergebnisse	71
3.1	<i>Inhibition der Proteolyse von Syntaxin 8 in Vti1b-ko-Mäusen</i>	<i>71</i>
3.2	<i>Endosomenfusionsassay</i>	<i>73</i>
3.2.1	Generelle Funktionsweise des Endosomenfusionsassays	74
3.2.2	Etablierung eines Endosomenfusionsassays für frühe und späte Endosomen aus MEF.....	75
3.2.3	Effizienz der Markeraufnahme in MEF in Abhängigkeit vom Genotyp und der markierten Organellen (frühe Endosomen, späte Endosomen).....	76
3.2.4	Endosomenfusionsassays mit Wildtypzellen sowie Vti1b-defizienten Zellen	78
3.2.5	Inhibierung der Fusion von frühen Endosomen mit affinitätsgereinigten Antikörpern	82
3.2.6	Probleme mit dem Endosomenfusionsassay	84
3.3	<i>RNAi von SNAP29 in Wildtyp-MEF und Vti1b-defizienten Zellen.....</i>	<i>84</i>
3.4	<i>Identifizierung von Syntaxin 16 als fehlende Komponente des endosomalen SNARE-Komplexes mit Vti1a</i>	<i>86</i>
3.4.1	Polyklonales Antiserum gegen Syntaxin 16.....	87
3.4.2	Gewebsspezifische Verteilung von Syntaxin 16	88
3.4.3	Vti1a, Syntaxin 6, VAMP4 und Syntaxin 16 bilden einen SNARE-Komplex	88
3.5	<i>Analyse von Vti1a-defizienten Mäusen.....</i>	<i>90</i>
3.5.1	Expression von SNARE-Proteinen in Vti1a-defizienten Zellen und Geweben	90
3.5.2	Aktivitäten von lysosomalen Enzymen in diversen Organen von Vti1a-defizienten Mäusen.....	93

3.6	<i>Analyse von MEF unterschiedlichen Genotyps mit Methoden der Immunofluoreszenz und der Internalisierung von Markern</i>	95
3.6.1	Immunfluoreszenzen	96
3.6.2	Rezeptorvermittelte Endozytose von fluoreszierendem LDL in MEF verschiedenen Genotyps	103
3.6.3	Fluid Phase-Uptake von FITC-Dextran in MEF verschiedenen Genotyps	108
3.6.4	Fluid Phase-Uptake von Avidin in MEF verschiedenen Genotyps	111
4	Diskussion	120
4.1	<i>Identifizierung eines SNARE-Komplexes bestehend aus Vti1a, Syntaxin 6, Syntaxin 16 und VAMP4</i>	120
4.2	<i>In vitro-Endosomenfusionsassay</i>	121
4.3	<i>Charakterisierung von Vti1a- sowie Vti1b-Defizienz im Mausmodell</i>	124
4.3.1	Proteinlevel von Syntaxin 8 in Vti1b-defizienten Mäusen sowie von Syntaxin 6 in Vti1a-defizienten Mäusen	127
4.3.2	Umverteilung von Vti1b in Vti1a-defizienten Zellen	128
4.3.3	RNAi von SNAP29 in Vti1b-defizienten Zellen.....	129
4.3.4	Analyse von Maus-embryonalen Fibroblasten verschiedenen Genotyps mit Immunofluoreszenz und Internalisierungsassays	130
4.3.4.1	Erhöhung der Transporteffizienz von endozytierten Markern in Vti1a-defizienten MEF	130
4.3.4.2	Retardierung des Transports von endozytierten Markern in Endobrevin/Vti1b-doppeldefizienten MEF	132
4.3.4.3	Umverteilung von MPR46 in Vti1a/Vti1b-doppeldefizienten MEF ...	133
5	Zusammenfassung	134
6	Literaturverzeichnis	136

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AP	Adaptorproteinkomplex
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	ADP-ribosylation factor
ATP	Adenosintriphosphat
BFA	Brefeldin A
BoNT	Botulinum Neurotoxin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CG	chromaffine Granula
cl.	Klon
Da	Dalton
DABCO	Diazobicyclooktan
DTT	Dithiothreitol
dest.	destilliert
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DMEM	Dubbecco's Modified Eagles Medium
DMP	Dimethylpimelidat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate
ds-RNA	Doppelstrang-RNA

E	Eluat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	early endosome
Endobr.	Endobrevin
ENTH	Epsin N-terminal homologe Domäne
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alteri (und andere)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GGA	Golgi-localized, γ -ear-containing, ARF-binding
Gly	Glycerin
GST	Glutathion
h	human
HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	horse radish peroxidase
HS	Pferdeserum
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropylthio- β -D-Galaktopyranosid
k	Kilo-
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KPi	Kaliumphosphat
l	Liter
LB-Medium	Luria-Broth-Medium
LDL	low-density lipoprotein
LE	late endosome
LSM	Laser-Scan-Mikroskop
Lys	Lysosom

m	milli-, Meter
M	molar
MEF	Maus-embryonale Fibroblasten
min	Minute(n)
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
μ	mikro
MW	Molekulargewicht
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NSF	<i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive factor
OD	optische Dichte
p	Plasmid
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC12	rat adrenal phaeochromatozytoma cells
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q	Glutamin
R	Arginin
RE	recycling endosome
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	siehe
S	supernatant
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
siRNA	small-interfering RNA
SM-Proteine	Sec1/Munc18-ähnliche Proteine

SNAP	Synaptosomen-assoziiertes Protein, lösliches NSF-Bindungsprotein
SNAREs	Soluble <i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptors
SSV	small synaptic vesicle
Syx	Syntaxin
t	targetmembrane
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TeNT	Tetanus Neurotoxin
TE	Tris-EDTA
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
Ü	Überstand
un	ungebunden
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v	vesicle
VAMP	Vesikel-assoziiertes Membranprotein
Vol.	Volumen
Vti1	Vps10-interacting 1
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

Die chemischen Elemente wurden mit den üblichen Symbolen abgekürzt.

1 Einleitung

In eukaryotischen Zellen sorgen Lipiddoppelschichten für eine Kompartimentierung des Zellinhaltes in verschiedene Organellen. Für die Zelle lebenswichtige Prozesse, wie Proteolyse in Lysosomen oder einander entgegengerichtete Stoffwechselwege, wie Glykolyse und Glukoneogenese, wären sonst nicht möglich. Jede Organelle wird durch eine spezifische Proteinzusammensetzung in ihrer Funktion definiert. Der zentrale Prozess in der Organisation von Membrankompartimenten ist der selektive Transport von Proteinen und Lipiden zwischen den verschiedenen Zellorganellen. Dazu knospen Transportvesikel von einem Donorkompartiment, um nach ihrem Transport zu einem Zielkompartiment mit diesem zu fusionieren. An diesem letzten Schritt, der Fusion zweier Lipiddoppelschichten, ist eine große Proteinfamilie beteiligt, die als SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptors*) bezeichnet wird.

1.1 Intrazelluläre Transportwege

Proteine werden während ihrer Synthese an Ribosomen ins endoplasmatische Retikulum (ER) eingeschleust und glykosyliert. Weitere Glykosylierungen finden während des Transports durch den Golgi-Apparat statt. Im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) angekommen, werden die Proteine anhand ihrer Glykosylierungen oder bestimmter Aminosäuresequenzen sortiert. Die Signalstrukturen treten mit zytosolischen Proteinen und Proteinen der Vesikelmembran, wie Adaptorkomplexe oder GGAs, in Wechselwirkung, die die Anlagerung von Hüllproteinen sowie Abschnürung und Transport der Transportvesikel, teilweise unter Beteiligung von Cytoskelett und Motorproteinen, begünstigen (HIRST und ROBINSON, 1998; GOVINDAN et al., 1995). Sekretorische Proteine werden für ihren Transport zur Plasmamembran entweder in Granula der regulierten Sekretion (SG) oder in kleinere sekretorische Vesikel (SV) verpackt. Lysosomale Membranproteine werden anhand von spezifischen Aminosäuresequenzen, z.B. Di-Leucin- oder Tyrosin-haltige Motive, in ihren

cytoplasmatischen Domänen erkannt. Lösliche lysosomale Proteine erreichen ihren Bestimmungsort, die Lysosomen, über späte Endosomen. Dieser Transport wird von zwei Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR) vermittelt, die spezifisch Proteine mit Mannose-6-Phosphatresten erkennen. Im späten Endosom dissoziieren lysosomales Protein und MPR voneinander. Die MPR werden zurück zum TGN transportiert und die lysosomalen Proteine weiter zu den Lysosomen, wo sie dem Abbau von intra- und extrazellulärem Material dienen (HILLE-REHFELD, 1995). Endozytiertes extrazelluläres Material gelangt über frühe (EE) und späte Endosomen (LE) ins lysosomale Kompartiment (Lys). Man unterscheidet Pinozytose, bei der die Zellen kleine Mengen extrazellulärer Flüssigkeit unspezifisch aufnehmen und Rezeptor-vermittelte Endozytose, bei der Rezeptoren selektiv Liganden binden, woraufhin Endozytose stattfindet. Recycling Endosomen (RE) transportieren Material von frühen Endosomen zurück zur Plasmamembran. Auch ein direkter Weg vom frühen Endosom zur Plasmamembran existiert.

Die Transportvorgänge innerhalb einer Zelle können anhand von Abbildung 1 nachvollzogen werden.

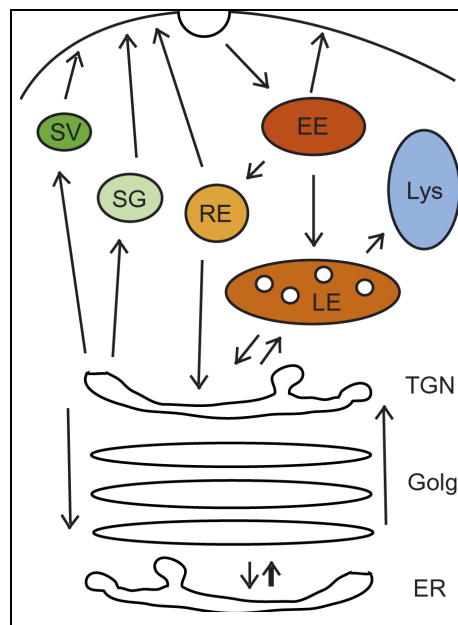


Abb. 1: Modell des intrazellulären Membrantransports

ER: endoplasmatisches Retikulum, TGN: trans-Golgi Netzwerk, LE: späte Endosomen, EE: frühe Endosomen, RE: recycling Endosomen, SG: sekretorische Granula, SV: sekretorische Vesikel

1.2 SNARE-Proteine

SNARE-Proteine sind eine heterogene Proteinfamilie, denen eine homologe Domäne von ca. 60 Aminosäuren gemeinsam ist, die auch als SNARE-Motiv bezeichnet wird (TERRIAN et al., 1997; WEIMBS et al., 1997; WEIMBS et al., 1998). Dieses SNARE-Motiv definiert ein Protein als SNARE-Protein und ist gleichzeitig funktionell bedeutend, da es die Assoziation von SNAREs zu einem Komplex vermittelt. Dabei findet eine Konformationsänderung des SNARE-Motivs von unstrukturiertem Motiv zur α -Helix statt.

Kriterien für die Einteilung von SNAREs in Subfamilien sind die Sequenzen des SNARE-Motivs, ob ein Protein ein oder zwei SNARE-Motive besitzt, sowie Art und Sequenzen der flankierenden Domänen.

Die meisten SNAREs bestehen aus einem SNARE-Motiv, dem eine variable N-terminale Sequenz vorausgeht und eine C-terminale Transmembrandomäne folgt. Zu dieser Subfamilie gehören z.B. Syntaxine, sowie Synaptobrevin und verwandte Proteine. Eine weitere Subfamilie wird durch das Fehlen einer Transmembrandomäne charakterisiert. Diese SNAREs werden in der Membran durch posttranslational angebrachte Lipide verankert. Ein Beispiel für diese Subfamilie ist SNAP-25 (Synaptosomen assoziiertes Protein mit einer relativen molekularen Masse von 25kD), dessen zwei SNARE-Motive von einer cysteinreichen Sequenz getrennt werden. Palmitylreste an den Cysteinen dienen als Membrananker (HESS et al., 1992).

Die meisten SNAREs vermitteln spezifisch nur eine Fusion. Beispielsweise findet man den an der Exocytose von synaptischen Vesikeln beteiligten neuronalen SNARE-Komplex auch auf frühen Endosomen, er ist jedoch nicht an der Fusion der Organellen beteiligt (LINK et al., 1993; WALCH-SOLIMENA et al., 1995). Diese Ergebnisse lassen auf eine strenge Regulation der Fusionsschritte schließen, an denen SNAREs teilnehmen können. Deshalb müssen Selektionsmechanismen existieren, die SNAREs für einen Membranfusionsschritt auswählen.

Die N-Termini von SNAREs sind meist durch separate Domänen charakterisiert. Diese unterscheiden sich zum Beispiel bei Syntaxinen, die in verschiedenen Transportwegen agieren, was für die Spezifität von Membranfusionen von Bedeutung sein könnte. Die SNARE-Motive aller Syntaxine sind homolog. Eine regulatorische Funktion der N-

terminalen Domänen von Syntaxinen wird diskutiert, z.B. kann Syntaxin 1 nicht gleichzeitig das Protein Munc18, ein für die Exozytose von synaptischen Vesikeln essentielles Protein, und andere SNAREs binden (SÜDHOF, 1995). Munc18 gehört zur Familie der SM-Proteine (*Sec1/Munc18*-ähnliche Proteine), die oft mit Syntaxin 1-ähnlichen SNAREs assoziiert sind. Es wird diskutiert, dass sie Organisatoren der Membranfusion sein könnten, indem sie einen Schritt vor der eigentlichen Fusion dafür sorgen, dass zwei Membranen einander erkennen und binden (JAHN, LANG und SÜDHOF, 2003).

Eine weitere Funktion der N-Termini von SNAREs ist die Bindung von Komponenten, die für die Ausbildung von Transpostvesikeln zuständig sind. So ist erst kürzlich herausgefunden worden, dass der N-Terminus des SNAREs Vti1b mit der Epsin N-terminalen homologen Domäne (ENTH-Domäne) von Enthoprotin/CLINT/epsinR interagiert, bzw. Vti1p mit der ENTH-Domäne von Ent3p in Hefe (CHIDAMBARAM et al., 2004). ENTH-Proteine werden bei der Bildung von Clathrin-beschichteten Vesikeln benötigt. Auch Adaptorkomplexe (APs) können an SNAREs binden, z.B. interagiert VAMP4 mit AP-1 am TGN (PEDEN et al., 2001). Diese Befunde implizieren eine Verknüpfung von Proteinen, die für Sortierungsmechanismen bzw. Membranfusionen verantwortlich sind und geben einen Hinweis auf Mechanismen, die für den Transport von SNAREs zu ihrem Wirkungsort sorgen.

1.3 Subzelluläre Lokalisation von SNAREs

Bisher wurden über 40 SNAREs in Säugern identifiziert. Auf allen Membranen intrazellulärer Kompartimente sind SNAREs zu finden. Allerdings ist bisher über die Funktion und Zusammensetzung der meisten SNARE-Komplexe wenig bekannt. Abbildung 2 zeigt die Lokalisation verschiedener, für die vorliegende Arbeit bedeutende SNAREs. SNAREs sind unter anderem Membranbestandteile von Transportvesikeln, die von Donor- zu Zielkompartimenten transportiert werden. Nach der Verschmelzung von Transportvesikel und Zielmembran muss ein SNARE-Protein mittels Recycling zurück zum Donorkompartiment gelangen. SNAREs sind deshalb auf mehreren intrazellulären Strukturen zu finden, z.B. ist Vti1a (s. 1.6.2.) sowohl am Golgi-Apparat, als auch auf dem

Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und auf endosomalen Strukturen lokalisiert. Daher ist die Lokalisation eines SNAREs kein Hinweis auf den Ort der Funktionsausübung (JAHN & SÜDHOF, 1999).

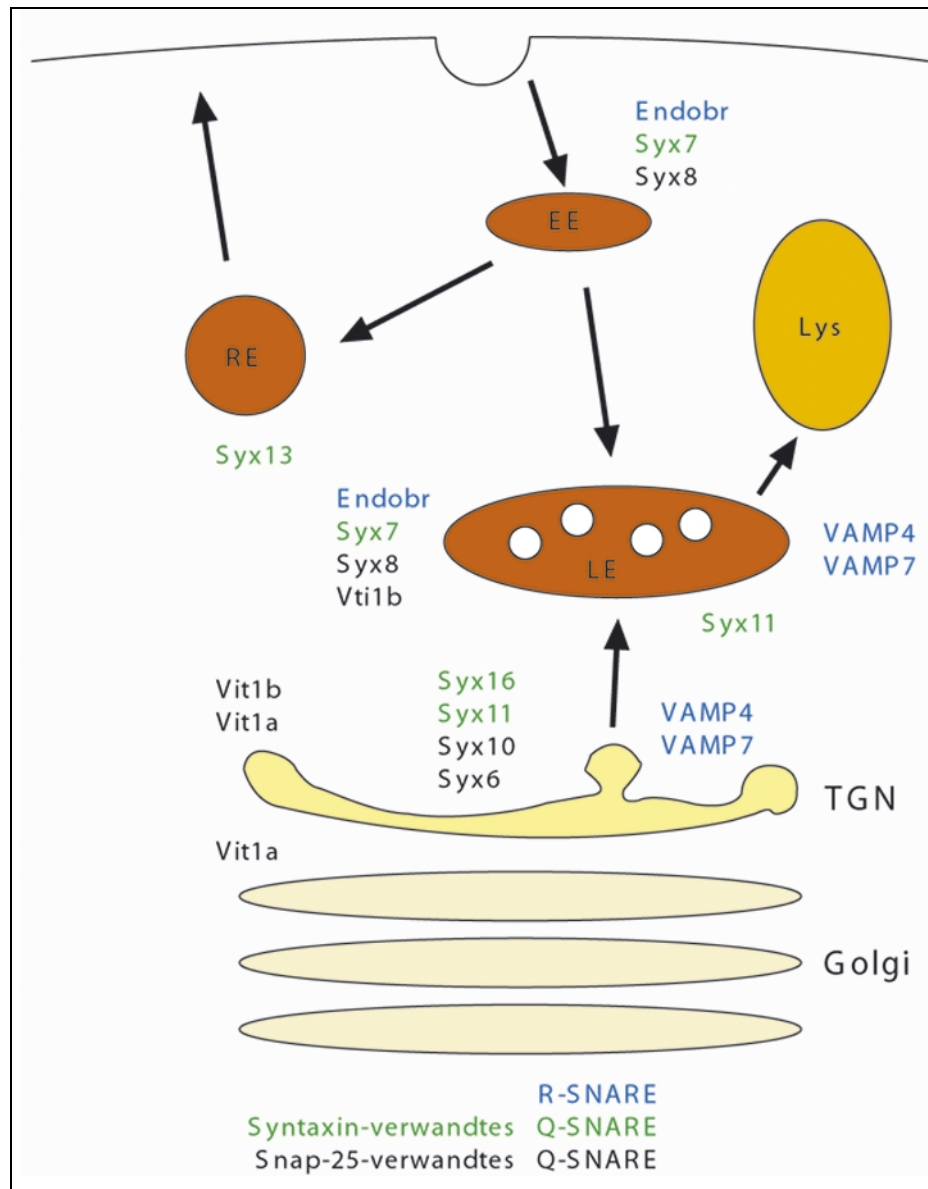


Abb. 2: Subzelluläre Verteilung von endosomalen Säuger-SNAREs

EE: early endosome (frühes Endosom), RE: recycling endosome (Aufbereitungsendosom), LE: late endosome (spätes Endosom), Lys : Lysosom, TGN : Trans-Golgi-Netzwerk, Syx: Syntaxin, R: Arginin, Q: Glutamin, Endobr: Endobrevin

1.4 Strukturelle Eigenschaften von SNARE-Komplexen

Der bisher am besten erforschte SNARE-Komplex (Abb. 3) vermittelt die Fusion von neuronalen Vesikeln mit der Plasmamembran, was zur Freilassung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt führt. Er besteht aus Syntaxin 1, Synaptobrevin und SNAP-25.

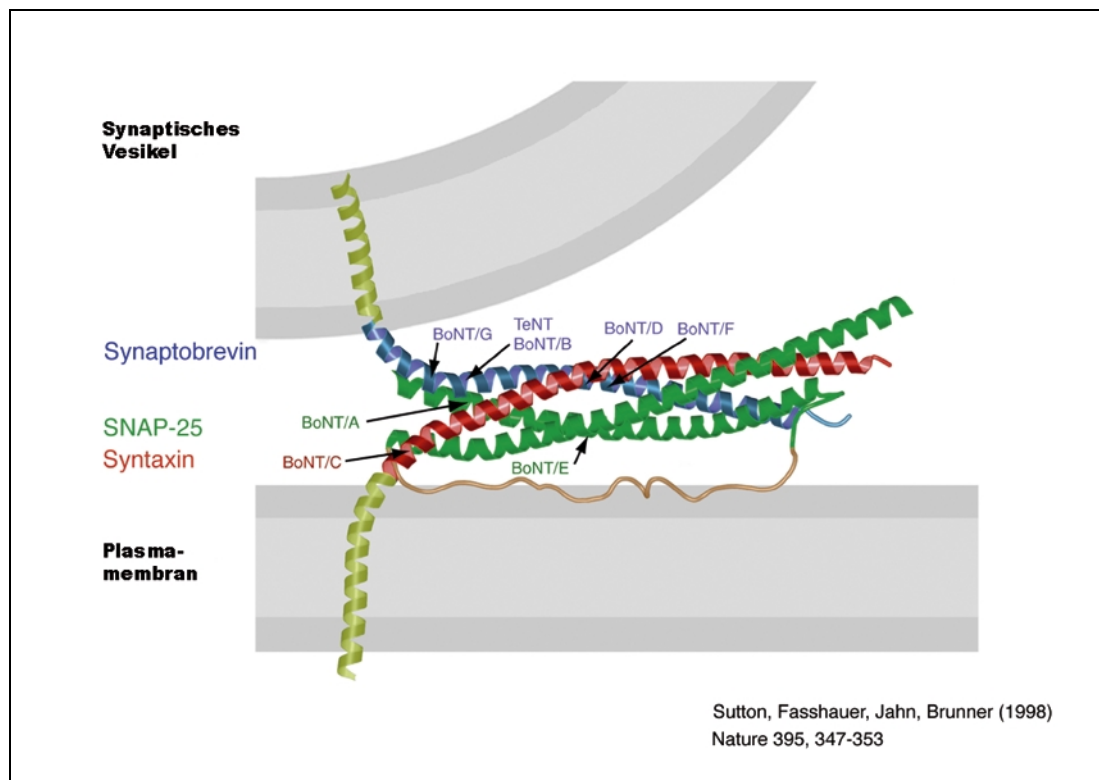


Abb. 3: Hypothetisches Modell des neuronalen SNARE-Komplexes

Der neuronale SNARE-Komplex, bestehend aus Synaptobrevin (blau), Syntaxin (rot) und SNAP25 (grün), wird hier nach seiner Bildung dargestellt. Außerdem sind die Schnittstellen der Botulinumtoxine (BoNT) und der Tetanustoxine (TeNT) aufgeführt. Dieses Modell basiert auf der Kristallstruktur des Komplexes.

Die Kristallstruktur des Komplexes ergab, dass je eine Helix von Syntaxin 1 und Synaptobrevin und zwei Helices von SNAP-25 sich zu einem parallelen Vier-Helix-Bündel zusammenlagern, welches mit dem klassischen coiled coil Modell von Crick verglichen werden kann. Bei einer α -Helix-Struktur weist jede siebte Aminosäure in die gleiche Richtung. Dafür werden zwei Windungen benötigt. Nach Crick werden in einem Vier-Helix-Bündel mit den ins Innere des Bündels weisenden Aminosäuren planare und

symmetrische Schichten (layers) gebildet, die im Idealfall senkrecht zur Bündelachse liegen. Jede dritte und darauffolgend vierte Aminosäure einer α -Helix ist an der Bildung solcher Schichten beteiligt. Eine Schicht wird von vier Aminosäuren gebildet, deren spezifische Wechselwirkungen das Vier-Helix-Bündel stabilisieren (SUTTON et al. 1998; CRICK 1953). Die SNARE-Motive des neuronalen SNARE-Komplexes sind ca. 60 Aminosäuren lang, d.h. insgesamt 16 solcher Schichten bilden das 12 nm lange Vier-Helix-Bündel, deren stabilisierende Interaktionen hauptsächlich hydrophober Natur sind (Abb.4). Eine Ausnahme bildet die sogenannte ionische „Schicht“ (ionic 0-layer) in der Mitte des Vier-Helix-Bündels, in der ein Argininrest (R) von Synaptobrevin mit drei Glutaminresten (Q) der restlichen drei SNARE-Motive von Syntaxin 1 und SNAP-25 interagiert.

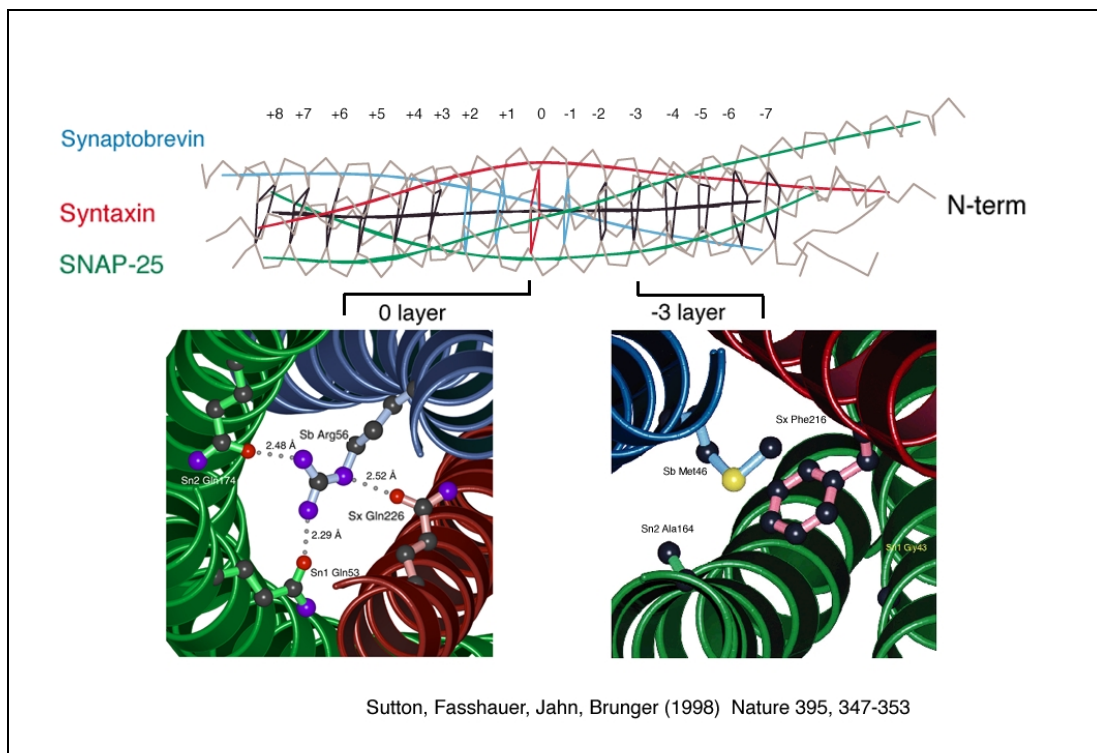


Abb.4: Lage von ionic 0-layer und -3-layer im vier Helix-Bündel des neuronalen SNARE-Komplexes mit Illustrierung der interagierenden Aminosäuren

Sx: Syntaxin 1

Sb: Synaptobrevin

Sn : SNAP25

Diese ionischen Interaktionen werden durch angrenzende Leucin-Reißverschluss-Motive und das Peptidrückgrat von der wässrigen Umgebung abgeschirmt, was zur Stabilität des Komplexes beiträgt. Zusätzlich sorgt die asymmetrische ionic 0-layer für eine korrekte Zusammenlagerung der vier Helices (SUTTON et al., 1998), welche wahrscheinlich am N-Terminus beginnt und sich nach dem Reißverschlusprinzip in Richtung C-Terminus fortsetzt. Außer der ionic 0-layer sind die Aminosäuren, die im Zentrum des Vier-Helix-Bündels die weiteren 15 Schichten ausbilden, hochkonserviert. Auf die herausragende Bedeutung der ionic 0-layer bezogen, wurden die anderen Schichten in Richtung C-Terminus positiv und in Richtung N-Terminus negativ durchnummeriert. Ein Beispiel für eine weitere Schicht ist die ebenfalls asymmetrische -3-layer, die beim neuronalen SNARE-Komplex von zwei großen Aminosäuren (Methionin vom R-SNARE Synaptobrevin und Phenylalanin von Syntaxin 1) und zwei kleinen von SNAP-25 (Glycin von der C-terminalen Helix und Alanin von der N-terminalen Helix) gebildet wird.

Ein weiterer gut charakterisierter SNARE-Komplex besteht aus den vier SNAREs Vti1b, Syntaxin 8, Syntaxin 7 und Endobrevin (siehe Kapitel 1.6.1.). Sowohl seine Kristallstruktur, als auch funktionelle Daten sind bisher die beste Unterstützung für die Hypothese, dass alle SNARE-Komplexe sich in ihrer Struktur insofern gleichen, als dass ein Komplex aus je vier unterscheidbaren α -Helices besteht (ANTONIN et al., 2000b; ANTONIN et al., 2002).

In Hefe wurden Erkenntnisse über einen SNARE-Komplex gewonnen, der an der Exocytose beteiligt ist. Dieser Komplex, der aus den Proteinen Sec9p, Snc1/2p und Sso1/2p besteht, zeigt viele Gemeinsamkeiten mit dem neuronalen SNARE-Komplex (GERST, 1997; RICE et al., 1997). Deshalb liegt es nahe, einige Eigenschaften als beispielhaft für alle SNARE-Komplexe anzusehen. SNARE-Komplexe sind z.B. außergewöhnlich stabil. Sie sind resistent gegen SDS, Hitze sowie gegen Proteasen.

1.5 Klassifizierung von SNARE-Proteinen

Die erste Klassifizierung von SNAREs erfolgte auf der Basis ihrer Lokalisation auf entweder Zielmembranen (t-SNAREs, targetmembrane-SNAREs) oder Transportvesikeln (v-SNAREs, vesicle-SNAREs) (SÖLLNER et al., 1993).

t-SNAREs wurden aufgeteilt in Syntaxin- und SNAP-25-Familien. Zu den v-SNAREs zählen unter anderem Vesikel-assoziierte Membranproteine (VAMPs) (TERRIAN et al., 1997; WEIMBS et al., 1997; WEIMBS et al., 1998).

Eine weitere Klassifizierung von SNAREs in Q- und R-SNAREs bezieht sich auf den schon erwähnten zentralen, konservierten Aminosäurerest im SNARE-Motiv und der Annahme, dass SNARE-Komplexe die gleiche Grundstruktur, bestehend aus vier α -Helices, haben. Drei Argininreste und ein Glutaminrest bilden mittels ionischer Wechselwirkungen die ionic 0-layer und tragen so zu der Stabilität eines SNARE-Komplexes bei. Syntaxine und SNAP-25-verwandte Proteine sind immer Q-SNAREs, Proteine der VAMP-Familie (v-SNAREs) sind immer R-SNAREs. Es gibt auch v-SNAREs mit einem Q-Rest, z.B. Vti1p, Bet1p

Die -3-layer von SNARE-Komplexen besteht aus zwei großen und zwei kleinen Aminosäuren. Die beiden großen Aminosäuren stammen jeweils von Synaptobrevin- und Syntaxin 1-Verwandten, die kleinen von SNAP-25 Homologen, zu denen auch eine Untergruppe der Syntaxine und Vti1-Proteine zählen. Aufgrund dieser Konservierungen in der -3-layer können Q-SNAREs eingeteilt werden in: Qa-SNAREs (Syntaxin 1 verwandtes Syntaxin), Qb-SNAREs (der N-terminalen Helix von SNAP 25 verwandt) und Qc-SNAREs (homolog zur C-terminalen Helix von SNAP 25) zu denen auch einige Syntaxine gehören. In vitro konnte gezeigt werden, dass sich auch promiske SNARE-Komplexe bilden können, die teilweise stabil waren, solange die QaQbQcR-Regel eingehalten wurde (FASSHAUER et al., 1999; YANG et al., 1999)

Die Klassifizierung von SNAREs in R- und Q-SNAREs bzw. Qa-, Qb- und Qc-SNAREs ist sinnvoller, als die Klassifizierung in t- und v-SNAREs, da letztere nicht immer mit strukturellen Unterschieden der einzelnen Unterfamilien korreliert werden können (FASSHAUER et al., 1998).

1.6 Funktion von SNAREs

Den ersten Hinweis auf die Beteiligung von SNAREs an der Fusion von Membranen erhielt man, nachdem Synaptobrevin, Syntaxin 1 und SNAP-25, also die Proteine des neuronalen SNARE-Komplexes, als Substrate für Neurotoxine, wie z.B. Tetanustoxin und

Botulinustoxin, identifiziert wurden (SCHIAVO et al, 1992; LINK et al., 1992; BLASI et al., 1993a; BLASI et al., 1993b; BINZ et al, 1994; SCHIAVO et al., 1994; SÜDHOF et al., 1993; NIEMANN et al., 1994; MONTECUCCO et al., 1995). Diese Toxine inhibieren die Exocytose von neuronalen Vesikeln, jedoch zeigen vergiftete Nervenendigungen keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu Kontrollen. Ein vollständig zusammengesetzter SNARE-Komplex ist gegen die Neurotoxine resistent (HAYASHI et al., 1994). Die Neurotoxine wirken also vor der Bildung eines SNARE-Komplexes und verhindern so die Bildung desselben und damit auch die Exocytose von neuronalen Vesikeln. Weitere Versuche mit Hefe und in vitro Transportassays bestätigten die essentielle Funktion von SNAREs bei der Membranfusion (UNGERMANN et al., 1998; MAYER et al., 1997; CAO et al., 1998).

Aufgrund der großen Vielfalt von SNAREs ist diskutiert worden, dass diese Proteine auch für die Spezifität von Membranfusionen verantwortlich sind. Studien in Hefe haben gezeigt, dass das nicht immer der Fall sein muss. Viele SNAREs, z.B. Vti1p, agieren in mehreren Transportschritten, was für eine Beteiligung von weiteren Proteinen, wie beispielsweise die schon erwähnten SM-Proteine oder Proteine der Rab-Familie, bei der Erkennung und Anheftung des korrekten Vesikels an die Zielmembran spricht (FISCHER von MOLLARD et al., 1997; LUPASHIN et al, 1997; LAZAR et al., 1997). Nach einer Modellvorstellung vermitteln Rab/YPT-Proteine die Bindung von Proteinkomplexen (tethering proteins), was zu einer lockeren Bindung von Vesikel- und Zielmembran (tethering) führt und als erste Stufe für Spezifität bewertet werden kann. Die zweite Stufe für Spezifität ist die, auf das Tethering und ein spezifisches Signal folgende Bildung des SNARE-Komplexes (docking), der vor der Membranverschmelzung als kurzlebiger Übergangszustand, dem sogenannten Trans-Komplex, vorliegt (WATERS et al., 2000).

Während der Bildung eines SNARE-Komplexes ändern die SNARE-Motive grundlegend ihre Konformation von unstrukturierten Motiven zu α -Helices, sehr wahrscheinlich beginnend am N-Terminus des helikalen Bündels. (FASSHAUER et al., 1997a; FASSHAUER et al., 1997b; XU et al., 1999). Durch diese Konformationsänderungen werden Vesikel- und Zielmembran eng zusammengebracht, was, unterstützt durch die freiwerdende Energie während der Komplexbildung, zur Membranverschmelzung führen soll (HANSON et al. 1997a, XU et al., 1999).

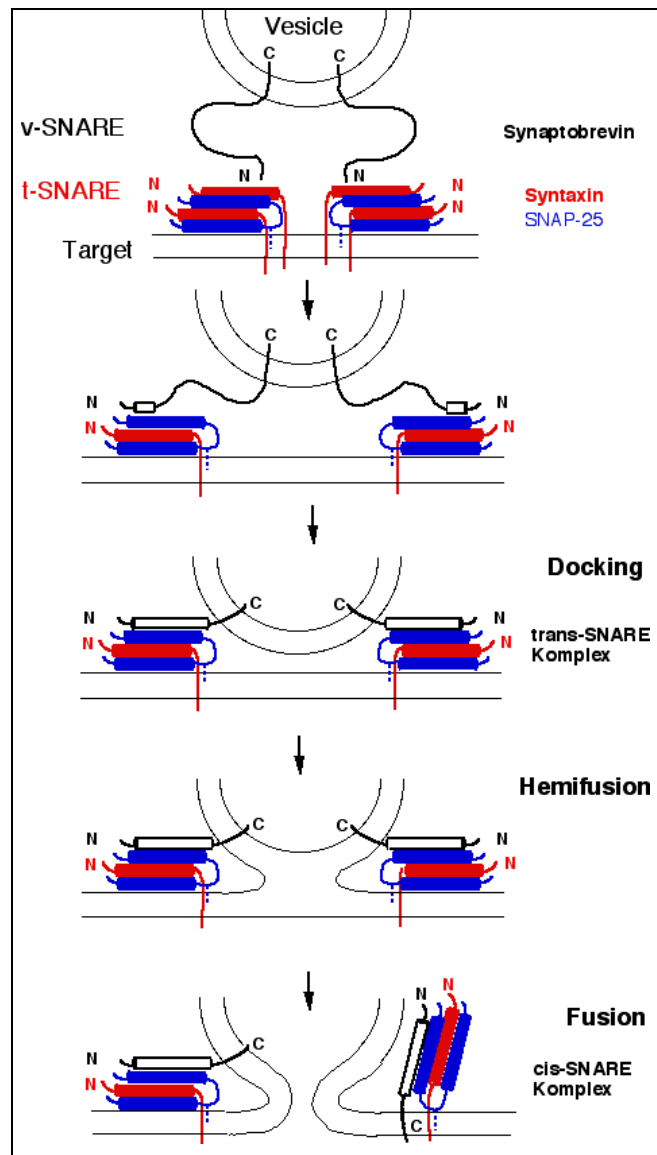


Abb. 5: Modell der SNARE-vermittelten Membranfusion

Dem als Hemifusion bezeichneten Zustand von verschmolzenen cytoplasmatischen Schichten der Lipidmembranen folgt die vollständige Fusion, die eine sogenannte Fusionspore öffnet. Diese Pore kann sich entweder irreversibel erweitern oder wieder schließen (Kiss and Run). Der nun vorliegende Komplex, bei dem die Membrananker aller beteiligten SNAREs in der gleichen Membran vorliegen, wird als cis-SNARE-Komplex bezeichnet.

Für die Dissoziation von SNARE-Komplexen bei intrazellulären Transportschritten ist das Chaperone N-ethylmaleimid sensitive-Faktor (NSF), eine ATPase, zusammen mit

löslichen NSF-Bindungsproteinen (soluble NSF attachment protein, SNAP) verantwortlich (ROTHMAN, 1994). SNAP muss am SNARE-Komplex gebunden sein, bevor NSF binden kann. Beide Proteine binden bevorzugt den zusammengesetzten Komplex (McMAHON et al., 1995), jedoch binden sie auch an einzelne Q-SNAREs (HAYASHI et al., 1995; PELLEGRINI et al., 1995; HANSON et al., 1995). Durch ATP-Hydrolyse zerfallen sowohl der vollständige als auch die partiellen Komplexe (HANSON et al., 1995). Die Dissoziation des SNARE-Komplexes ermöglicht den beteiligten SNAREs nach dem Recycling für eine weitere Membranfusion zur Verfügung zu stehen. Es gibt Hinweise darauf, dass die Bildung von SNARE-Komplexen nicht der letzte Schritt in der Membranfusion ist. Während der *in vitro* Fusion von Vakuolenvorstufen in Hefe werden SNARE-Komplexe gebildet, können jedoch vollständig dissoziiert werden, bevor eine Membranfusion stattgefunden hat (UNGERMANN et al., 1998). Es konnte mit einem Stadium-spezifischen Assay gezeigt werden, dass Antikörper gegen SNAREs wirken, bevor die Fusion von Phosphataseinhibitoren und amphiphilen Peptiden wie Mastoparan verhindert wurde. Ein Protein, das für die späte Membranfusionsreaktion verantwortlich sein könnte, ist ein Calmodulin-bindendes Protein, da Calmodulin an den späten Fusionsschritten beteiligt ist (PETERS et al., 1998). Außerdem wurde beschrieben, dass Membransegmente von ATPasen auf beiden Membranen Komplexe bilden, die für die Fusion benötigt werden (PETERS et al., 2001). Jedoch ist zu bedenken, dass durch das benutzte Vakuolenassay nur Fusionen mit einer vollständig geöffneten Fusionspore erkannt werden können, wogegen Zwischenstadien mit unvollständig geöffneten Poren nicht detektiert werden können.

1.7 Vti1

Das Qb-SNARE Vti1p aus Hefe ist an mehreren Transportschritten beteiligt. Es vermittelt den Transport vom Golgiapparat zu Endosomen, sowie den retrograden Transport zum cis-Golgi. Außerdem wird es für mindestens zwei Transportwege in die Vakuole, einmal für den direkten Weg vom TGN zur Vakuole, sowie über Endosomen zur Vakuole, die in Säugerzellen dem Lysosom entspricht, benötigt. Auch an der homotypischen Vakuolenfusion sowie der Autophagozytose ist Vti1p beteiligt (FISCHER von

MOLLARD et. al. 1997; FISCHER von MOLLARD et al., 1999). Zusätzlich ist Vti1p in der homotypischen Fusion von TGN und dem retrograden Transport zum TGN involviert (BRICKNER et al., 2001).

VtII ist ein essentielles Gen, dessen Deletion letal ist (FISCHER von MOLLARD et al., 1997).

Verschiedene Vti1-Homologe wurden mittels Gendatenbanksuche gefunden. Abbildung 3 zeigt einen Sequenzvergleich von fünf Vti1-Homologen, die alle ein SNARE-Motiv besitzen. C-terminal befindet sich eine Transmembrandomäne, N-terminal sind wenig konservierte Aminosäurereste zu finden.

Vti1	MSSLLISYE	SDFKTTLQAKASLA	EAPSQP-LSQRNTTL	KHVEQQQDELFDLDD	53
CeVti1	MSNQSATVEQLSGFE	KQYSLQPAEITSKIG	RVHTLP-SSDRAGAV	QEIRKSLEEVNDLDD	59
mVti1b	MAASAASSEHFELKH	EIFRGLLEDLQGVPE	RLLGTTAGTEEEKKLV	RDFDEKQOEANETLA	60
rVti1a	MSADFEGYE	QDFAVLTAETSKIS	RVPRLP-PDEKKQMV	ANVEKQLEEARLELE	53
rVti1a-β	MSADFEGYE	QDFAVLTAETSKIS	RVPRLP-PDEKKQMV	ANVEKQLEEARLELE	53
Vti1	QMDVEVNNSIGDASE	RATYKAKLREWKKTI	QSDIKRPLQSLVDSG	DRDRLFG-----D	106
CeVti1	QMELVVRELESNTTE	RTKYELRVRSYQSDK	K-QLDTELEKAI-KR	VREEADRDELLAFDD	117
mVti1b	EMEEELRYAP--LTF	RNPMMSKLRNRYKDL	AKLHREVRSTPLTAA	PGGRGDLKYGYTAAE	118
rVti1a	QMDLEVREIP--PQS	RGMYSNRMRSYKQEM	GKLETDFKRSRIAYS	DEVNR-----ELL	104
rVti1a-β	QMDLEVREIP--PQS	RGMYSNRMRSYKQEM	GKLETDFKRSRIAYS	DEVNR-----ELL	104
Vti1	LNASNIDDDQ-----	--RQQLLSNHAILQK	SGDRLKDASRIANET	EGIGSQIMMDLRSQR	159
CeVti1	QLDEHR---Q-----	--EDQLIANTQRLER	STRKVQDAHRIAVET	EQIGAEMLSNLASQR	167
mVti1b	NEHLNRLQSQ-----	--RALLLQGTESLNR	ATQSIERSHRIATET	DQIGTEIIEELGEQR	171
rVti1a	GDAGNSSENQ-----	--RAHLLDNTERLER	SSRLEAGYQIAVET	EQIQOEMLENLSDR	157
rVti1a-β	GDAGNSSENQLIKLR	EERAHLLDNTERLER	SSRLEAGYQIAVET	EQIQOEMLENLSDR	164
		* * *	* * *	* * *	
Vti1	ETLENARQTLFQADS	YVDKSIRTKLTMTRR	LVANKFISYAIIVL	ILLILLVLFSSKFK	217
CeVti1	ETIGRSRDRLRQNSA	DLGRANKTLSSMIRR	AIQNRLLLLIVTFLL	SFMFLYIVY-KAI	224
mVti1b	DQLERTKSRLVNTNE	NLSKSRKILRSMSRK	VITNKILLSVILILE	LAILVGLVYKFFRRH	232
rVti1a	ERIQRARERLRETD	NLGKSSRILTGMLRR	IIQNRILLVILGIIV	VITILTAITFFVVRGH	217
rVti1a-β	ERIQRARERLRETD	NLGKSSRILTGMLRR	IIQNRILLVILGIIV	VITILTAITFFVVRGH	224
	* * *	* * *			

Abb. 6: Sequenzvergleich von fünf Vti1-Homologen

Vti1p (*Saccharomyces cerevisiae*), ein C-terminales Fragment von *C. elegans*, Vti1 b der Maus, Vti1a und Vti1a-β der Ratte sind hier im Sequenzvergleich dargestellt. Gefüllte Kreise stehen für Anfang und Ende des SNARE-Motivs, der offene Kreis markiert die Position des konservierten Glutamin- oder Aspartatrestes in der ionic 0-layer. Die Sternchen zeigen Aminosäurereste an, die ins Innere des Helixbündels zeigen und dort Schichten (layer) von interagierenden Aminosäuren bilden. Die Transmembrandomänen sind durch ein Kästchen markiert.

In Säugern existieren zwei Vti1-Homologe, Vti1a (27 kD) und Vti1b (29 kD). Im Hirn wurde neben Vti1a eine hirnspezifische Splicevariante von Vti1a, Vti1a-β (29 kD),

gefunden (LUPASHIN et al., 1997; FISCHER von MOLLARD et al., 1998, ANTONIN et al. 2000a). Direkt N-terminal vor dem SNARE-Motiv hat Vti1a- β sieben zusätzliche Aminosäuren (LIKLREE), die möglicherweise eine Bedeutung für die zelluläre Verteilung haben könnten (ANTONIN et al., 2000a).

Maus-Vti1a und Vti1b sind in nur ca. 30% ihrer Aminosäuresequenz identisch. Mit Vti1p teilen sie 33% bzw. 27% der Aminosäuresequenz.

Im Gegensatz zu anderen Q-SNAREs und allen anderen Vti1-Proteinen haben Maus- und Ratten-Vti1a ein Aspartat an der Stelle des sonst hochkonservierten Glutamins. Ein Aspartatrest ist aber auch in der Lage starke ionische Interaktionen mit Argininresten in der ionic 0-layer einzugehen (ANTONIN et al., 2000a).

1.7.1 Vti1b

Mit Immunofluoreszenz- und Immuno-elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde Vti1b tubulären und vesikulären Strukturen in der Nähe des TGN sowie endosomalen Strukturen zugeordnet (KREYKENBOHM et al., 2002). Vti1b ist Teil eines SNARE-Komplexes, der an der Fusion von späten Endosomen beteiligt ist. Mit einem Endosomenfusionsassay konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen Vti1b, nicht jedoch Antikörper gegen Vti1a, die homotypische Fusion von späten Endosomen signifikant beeinträchtigen (ANTONIN et al., 2000b). Die Interaktionspartner dieses Komplexes sind Syntaxin 7, Vti1b, Syntaxin 8 und Endobrevin (auch VAMP8 genannt). Andere Studien, die sich ebenfalls eines Endosomenfusionsassays bedient haben zeigten, dass Syntaxin 7 für die homotypische Fusion von Lysosomen, sowie die Fusion von späten Endosomen mit Lysosomen benötigt wird (WARD et al., 2000; MULLOCK et al., 2000). Eine andere Arbeitsgruppe wies mittels eines Fusionsassay nach, dass Vti1b zusätzlich an der heterotypischen Fusion von späten Endosomen mit Lysosomen beteiligt ist. Die Interaktionspartner dieses Komplexes sind Syntaxin 7, Vti1b, Syntaxin 8 und VAMP7 (PRYOR et al., 2004). Auch die SNARE-Partner von Vti1b sind auf verschiedenen Organellen lokalisiert. So findet man Syntaxin 7 auf frühen Endosomen (PREKERIS et al., 1999) und auf späten Endosomen (MULLOCK et al., 2000), Endobrevin ist ebenfalls in diesen Kompartimenten zu finden (ANTONIN et al., 2000c)

und Syntaxin 8 ist auf frühen Endosomen (SUBRAMANIAM et al., 2000) und am TGN (PREKERIS et al., 1999) lokalisiert. Da neusynthetisierte Proteine sowie Proteine, die ihre Funktion ausgeübt haben, an den Ort ihrer Wirkung gebracht werden müssen, ist eine subzelluläre Verteilung auf verschiedene Organellen zu erwarten.

In vitro Bindungsassays mit rekombinanten löslichen SNAREs haben gezeigt, dass Syntaxin 7 im neuronalen SNARE-Komplex Syntaxin 1 ersetzen kann, Endobrevin durch Synaptobrevin austauschbar ist und Vti1b sowie Syntaxin 8 für die zwei Helices von SNAP-25 stehen können. In Kombination mit strukturellen Vergleichen sowie Sequenzanalysen lässt sich also behaupten, dass jedes SNARE-Protein eine bestimmte Position in einem Komplex einnimmt. Beispielsweise besitzen Syntaxin 1 und Syntaxin 7 in der -3-layer ein Phenylalanin, Synaptobrevin und Endobrevin je ein Methionin, also große Aminosäuren. Vti1b sowie Syntaxin 8 haben in der -3-layer je ein Glycin, das mit Glycin und Alanin, beides kleine Aminosäuren, von den SNAP-25-Helices gleichgesetzt werden kann. Vti1b entspricht dabei der N-terminalen Helix von SNAP-25, Syntaxin 8 der C-terminalen Helix von SNAP-25 (ANTONIN et al., 2000b). Diese Analyse wurde durch die Kristallstruktur dieses Komplexes bestätigt (ANTONIN et al., 2002).

Um die Funktion von Vti1b in vivo zu studieren, wurden durch gezielte Zerstörung des für das SNARE-Motiv codierenden Exons Vti1b-knockout-Mäuse generiert (ATLASHKIN et al., 2003). Aus Kreuzungen von Vti1b-heterozygoten Tieren wurden, den Mendelschen Regeln entsprechend, 25% defiziente Tiere geboren. Vti1b-defiziente Mäuse sind lebensfähig und fertil. Ca. 20% der Vti1b-defizienten Mäuse waren kleiner und leichter als ihre ebenfalls defizienten, jedoch äußerlich und gesundheitlich nicht vom Wildtyp zu unterscheidenden Wurfgeschwister. Bei ihnen konnten gehäuft vergrößerte Gallenblasen, Glycogen-haltige Globuli in Hepatocyten und bei älteren Tieren öfter Leberzysten gefunden werden. Der Transport von Cathepsin D war nicht beeinträchtigt, aber die Degradierung von Asialofetuin in Lysosomen, das über Rezeptor-vermittelte Endocytose in Hepatocyten gelangt, war langsamer als bei Wildtyp-Mäusen und normal großen defizienten Tieren. Mittels Immunoblottings konnte in Vti1b-defizienten Organen kein Vti1b, in Vti1b-heterozygoten eine gegenüber dem Wildtyp verringerte Menge von Vti1b nachgewiesen werden. Interessanterweise waren Proteinmengen von Syntaxin 8 in Gewebehomogenaten von Vti1b-defizienten Tieren reduziert (ATLASHKIN et al., 2003).

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass diese Reduktion mit verstärkter lysosomaler Degradierung erklärt werden kann.

Alle Befunde die Vti1b-defizienten Mäuse betreffend sprechen bisher dafür, dass andere SNARE-Proteine den Verlust von Vti1b und Syntaxin 8 kompensieren können.

Um die Auswirkungen des Verlustes eines weiteren Partners des Vti1b-SNARE-Komplexes zu untersuchen, wurden Vti1b-defiziente Mäuse mit Endobrevin-defizienten Mäusen gekreuzt. Die vom Jackson Laboratory, USA gekauften Endobrevin-defizienten Tiere wurden mit der Technik des gene trapping generiert. Der für diese Methode benutzte Vektor enthält zwei funktionelle Sequenzen, die eine hat eine Splicing-Akzeptor-Stelle, gefolgt von einem Reportergen und einer Polyadenylierungssequenz, die zweite beginnt mit einem Promotor, an den das Puromycin N-Acetyltransferasegen und anschließend eine Splicing-Donor-Stelle fusioniert wurde. Dieser Vektor wird in embryonale Stammzellen transfiziert und von positiven Klonen wird mittels PCR die Insertionsstelle identifiziert.

Bei den durch Kreuzung erhaltenen Endobrevin/Vti1b-doppeldefizienten Mäusen gab es ebenfalls größere, phänotypisch normale Tiere, die fertil waren und nicht verfrüht starben, sowie sehr kleine Tiere, von denen 67% starben, bevor sie einen Monat alt waren. Diese kleinen Mäuse haben einen verkleinerten Thymus, dessen Morphologie zusätzlich stark gestört ist.

In Übereinstimmung mit Vti1b-defizienten Mäusen enthielten Gewebekomponenten von Endobrevin/Vti1b-doppeldefiziente Mäuse weniger Syntaxin 8 (KANVAR, 2004).

1.7.2 Vti1a

Vti1a ist hauptsächlich im Golgi-Apparat und dem TGN lokalisiert. Eine Behandlung von NRK-Zellen mit Brefeldin A führte zu einer Umverteilung des Golgi-ähnlichen Verteilungsmusters von Vti1a (KREYKENBOHM et al., 2002).

Mit einer in vivo Studie konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen Vti1a den Transport innerhalb des Golgi-Apparates blockieren (XU et al., 1998).

Antikörper gegen Vti1a, nicht jedoch gegen Vti1b, hemmen die Fusion früher Endosomen, die Fusion später Endosomen wurde von Antikörpern gegen Vti1a nicht

beeinträchtigt (ANTONIN et al., 2000 b). Eine weitere Studie untersuchte die SNARE-Abhängigkeit des Transports der β -Kette des Shigatoxins von frühen Endosomen ins TGN. Es konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen Syntaxin 6, Syntaxin 16 und Vt1a den Transport des Toxins in das TGN verhinderten. Außerdem waren noch die R-SNAREs VAMP3 und VAMP4 bei diesem Transportschritt beteiligt (MALLARD et al., 2002). Diese Untersuchungen implizieren eine Funktion von Vt1a innerhalb des Golgi-Apparates bzw. bei der homotypischen Fusion von frühen Endosomen sowie beim retrograden Transport von frühen Endosomen oder recycling Endosomen zum TGN.

Die unterschiedliche subzelluläre Verteilung von Vt1a und Vt1b sowie die Ergebnisse der Endosomenfusionsassays lassen darauf schließen, dass die beiden Homologe unterschiedliche Funktionen erfüllen.

Die gehirnspezifische Splicevariante von Vt1a, Vt1a- β konnte in synaptischen Vesikeln angereichert werden, ist jedoch nicht Teil des an der Exozytose beteiligten SNARE-Komplexes. Vt1a- β wurde ebenfalls in Clathrin-beschichteten Vesikeln und frühen Endosomen gefunden, Zellkompartimenten, die am Recycling und der Biogenese von synaptischen Vesikeln beteiligt sind. Diese Befunde sprechen für eine Beteiligung von Vt1a- β an einem SNARE-Komplex, der einen Membranfusionsschritt während des Lebenszyklus von synaptischen Vesikeln vermittelt (ANTONIN et al., 2000a).

Die Interaktionspartner von Vt1a/Vt1a- β wurden durch Immunopräzipitation ermittelt. Syntaxin 6 und VAMP4 habe ich in meiner Diplomarbeit als Partner identifiziert. Sie können ebenso wie Vt1a- β auf kleinen synaptischen Vesikeln sowie Clathrin-beschichteten Vesikeln gefunden werden (KREYKENBOHM et al., 2002).

1.8 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit SNARE-Proteinen, die die Fusion zweier Membranen vermitteln. Dabei sollte insbesondere der endosomale bzw. lysosomale Membrantransport untersucht werden, in dem die beiden Qb-SNAREs Vt1a und Vt1b eine Rolle spielen. Die Analyse und Charakterisierung dieser beiden SNAREs war das Ziel dieser Dissertation.

Ein Teilziel dieser Arbeit war es, mittels Affinitätschromatographie den noch fehlenden vierten Interaktionspartner eines Vt1a-beinhaltenden SNARE-Komplexes zu ermitteln.

Zusätzlich sollte ein *in vitro*-Fusionsassay für Maus-embryonale Fibroblasten etabliert und die Fusion von frühen und späten Endosomen in Zelllinien verschiedenen Genotyps analysiert werden.

Da in *Vti1b*-defizienten Zellen die Proteinmengen von Syntaxin 8 reduziert sind, sollte nach dem Grund dafür gesucht werden. Außerdem sollte mit gegen SNAP29 gerichteter RNAi nach möglichen Kompensatoren der *Vti1b*-Defizienz in *Vti1b*-defizienten Zellen gesucht werden.

Die Charakterisierung von *Vti1a*-defizienten Mäusen und MEF mit Methoden des Immunoblottings, der Immunofluoreszenz und verschiedenen Internalisierungsassays sollte dem Ermitteln eines Phänotyps sowie des für *Vti1a*-Defizienz kompensierenden Proteins oder Komplex dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Allgemeine Glaswaren	Schütt, Göttingen
Analysenwaagen Typ CP225D und M5P	Sartorius, Göttingen
Autoklav Typ Tecnoclav 50	Tecnomara, Zürich Schweiz
Brutschrank Typ 2771	Heraeus, Osterode, Köttermann, Häningsen
Drehrad für Eppendorffgefäße	Eigenbau, Werkstatt des Instituts
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresekammern für Agarosegele und Polyacrylamidgele	Eigenbau, Werkstatt des Instituts
Elektroporator 1000 Stratagene	Cortland NY, USA
SDS-Elektrophorese-System	Eigenbau, Werkstatt des Instituts
Filmentwicklungsmaschine Gevomatic 60	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Fraktionierer für Gradienten	Eigenbau, Werkstatt des Instituts
French [®] Pressure Cell Press, SLM-Aminco [®]	Spectronic Instruments
Vol: Große Zelle: 37 ml	
Gefrierschrank -80 °C	Colora Messtechnik, Lorch
Geltrockner	Bio-Rad, Hilden
Heizblock 5320	Eppendorf, Hamburg
Inkubator für Säugerzellen:	Labotec GmbH Göttingen
Infrared CO ₂ Inkubator Labotec	
Inkubationsschüttler Modell G25	New Brunswick Scientific Edison, USA
Luminescent Image Analyzer	Fuji photo film Co. Ltd., Japan
Fujifilm LAS-1000 plus	
Leica TCS SP2 AOBS	Leica microsystems Heidelberg

Filter freies Mikroskop	GmbH, Deutschland
Objektive für das Leica DM IRE2:	Leica microsystems Heidelberg
HCX PL APO 63 x/1,4 - 0,6 mm	GmbH, Deutschland
HCX PL APO 40 x/1,25 mm	
Magnetrührer Ika-Combimag Ret	Janke & Kunkel, Staufen
Mikrowellenherd	Bosch, Stuttgart
Multipette, Combitips	Eppendorf, Hamburg
Peristaltikpumpe, P1	Pharmacia, Uppsala Schweden
pH-Meter CG 820	Schütt, Göttingen
Photometer, UV 160 A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Semi-Dry-Blot-System	cti GmbH, Idstein/Taunus
Spannungsgeräte	Hölzel, München
Spektralphotometer Modell Uvikon 810	Kontron, Eching
Spektralphotometer, fluoreszierend F1200	HITACHI, Tokyo, Japan
Sterilbank, Typ A/B3	Baker Company, Inc., USA
Stickstofftank Biosafe Chronos	Messer Griesheim, Frankfurt/M
Ultraschall-Desintegrator Sonifier W-450	Branson Ultrasonic SA, Carouge- Geneve, USA
Ultra Turrax Ika Labortechnik	Janke & Kunkel, Staufen
Vortex-Genie	Bender & Hobein, Zürich
Waagen Typ 1264 MP und 1265	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbad Typ HOR 7225	Köttermann, Häningsen
Wipptisch	Eigenbau, Werkstatt des Instituts
Zentrifugen:	
Biofuge A	Heraeus Sepatech, Osterode/Harz
Biofuge Fresco	Heraeus Sepatech Osterode/Harz
Eppendorfszentrifuge 5414 und 5415	Eppendorf, Hamburg
Labofuge GL	Heraeus Sepatech, Osterode/Harz
Kühlzentrifuge, Modell J-21 C und J2-MC	Beckmann, München
Rotoren für die Kühlzentrifuge:	
JA-10 Rotor, bis 17680 x g	Beckmann, München

JA-20 Rotor, bis 48300 x g	Beckmann, München
Tisch-Ultrazentrifuge TL-100 mit Rotor	
TLA-100.3, bis 430.000 x g	Beckmann, München

2.1.2 Geräte zur Präparation von Organen

Chirurgische Schere; klein, gebogen	Aesculap, Tuttlingen
Chirurgische Schere; mittel, gerade	Aesculap, Tuttlingen
Peristaltik-Pumpe	Spetec, Erding
Pinzette, watchmaker # 5	A. Dumont & Fils/Schweiz
Pinzette, stumpf	Aesculap, Tuttlingen
Präparationstisch	Eigenbau (Werkstatt)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Carbogen (95% O ₂ /5% CO ₂)	Messer Griesheim, Krefeld
Cellophanfolie	Pütz-Folien, Taunusstein
Dialyseschlauch	Biomol, Hamburg
Einfrierkästen	National Lab, Mölln
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Einmalkanülen	Neoject, Gelnhausen
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Elektroporationsküvetten	Invitrogen, Leek, Niederlande
Gewebekulturschalen 35 und 60 mm Ø	Greiner, Nürtingen
Glaskolben 100ml, 250 ml, 1000 ml	Schott, Mainz
Hybond-N Filter	Amersham, Braunschweig
Immersionsöl 518C	Zeiss, Oberkochen
Kanülen (steril), 22G	Braun, Melsungen
Nitrocellulose Blotting Membran 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Objektträger und Deckgläser	Menzel Gläser
Parafilm [®]	American National, Neenah, USA

Pasteurpipetten	Schütt, Göttingen
Pipettenspitzen, 10, 200, 1000 µl	Sarstedt, Braunschweig
Plastikröhrchen, klein (10 ml), groß (50 ml)	Greiner, Nürtingen
Plastikpipetten, steril (5, 10, 25 ml)	Greiner, Nürtingen
Plastik-Petrischalen 9 cm Ø	Sarstedt, Nürnbrecht
Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen	Beckmann, München
PVDF Transfermembran	Schleicher und Schüll, Dassel
Reaktionsgefäße 0.5, 1.5, 2 ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Röntgenfilme, XAR-5	Kodak, Stuttgart
1 ml-Spritze , steril	Sherwood, Ballymoney, Irland
Skalpelle, steril	Braun, Melsungen
Sterile Plastikröhrchen 10, 50 ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Sterilfilter	Sarstedt, Nürnbrecht
Whatman GB003-Papier	Whatman Vertrieb, Göttingen
Zentrifugenbecher: JA-10 Polypropylen, JA-20	Beckmann bzw Nalgene, München
Zentrifugenadaptoren	

2.1.4 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Aldrich Chemical Company (Milwaukee, USA), Baker (Deventer, Niederlande), BioRad (München), Boehringer (Mannheim), Calbiochem (Frankfurt), Fluka (Buchs, Schweiz), GIBCO/BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) im Reinheitsgrad *pro analysi* bezogen.

ABTS (2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin -6-sulfonsäure)	Sigma
Aceton	Merck
Agar	Sigma
Agarose	Sigma

Albumin aus Rinderserum (BSA)	Serva
Ammoniumacetat	Fluka
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ammoniumsulfat	Merck
Bacto-Hefe-Extrakt	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Bisacrylamid	BioRad
Bromphenolblau	BioRad
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck
Chloroform	Merck
Coomassie, Serva BlueR	Serva
DAKO [®] mounting Medium	Carpinteria, CA, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Serva
EDTA-Na ₂ x H ₂ O	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Serva
FITC-Dextran, MW=14000	Sigma
Formaldehydlösung 37%	Merck
Glukose	Merck
Glutaraldehyd	Serva
Glutathion, reduziert	Merck
Glycerin	Merck
Glycin	Roth
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin- N'-2-ethansulfonsäure)	Serva
Imidazol	Merck
Kaliumacetat (KAc)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck

Kreatinphosphat	Roche
2-Mercaptoethanol	Sigma
Magnesiumacetat	Merck
Methanol	Roth
Mowiol	Calbiochem
Natriumacetat (NaAc)	Merck
Natriumazid	Sigma
Natriumcarbonat	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
Phenol	Merck
Saccharose	Merck
Salzsäure	Merck
Sephadex G-50	Pharmacia
Sodiumdodecylsulfat	Sigma
TEMED N'N'N'N'Tetramethylethylendiamin	Sigma
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
TRIS Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Trypanblau	Boehringer
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen

2.1.5 Enzyme und Nukleotide

DNase I	Boehringer, Mannheim
Insulin, biotinyliert	Sigma
Hexokinase	Roche
HRP (horseradish peroxidase), biotinyliert	Pierce
HRP (horseradish peroxidase)	Pierce
Kreatinkinase	Roche
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim
Gibco BRL, New England Biolabs,	USA
Trypsin, modifiziert aus Rinderpankreas	Boehringer, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Ultrapure dNTP Set	Pharmacia, Freiburg

2.1.6 Kits zur Bearbeitung von DNA und Proteinen

QIAquick Gel Extraktion	Qiagen, Hilden
QIA-Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIA-Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Effectene	
ECL-System	Pierce, Illinois

2.1.7 Proteine, Proteinaseinhibitoren und Proteinstandards

Avidin	Pierce
BODIPY [®] -LDL	Molecular Probes USA
Lactacystein	Calbiochem
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg

RainbowTM-coloured protein MG-Standard

Amersham, Braunschweig

2.1.8 Substrate für das Enzymassay

4-Methyl-Umbelliferyl-2Acetamido-deoxy- β -D-Glucopyranosid

4-Methyl-Umbelliferyl- β -D-Galactopyranosid

4-Methyl-Umbelliferyl- β -D-Glucopyranosid

4-Methyl-Umbelliferyl- β -D-Mannopyranosid

Diese Substrate stammen von der Firma Sigma.

2.1.9 Antikörper

2.1.9.1 Primärantikörper

Antigen	Immunisierte Spezies	Aufarbeitung	Referenz
Avidin, Huhn	Ziege		Calbiochem
GM130	Maus		Transduction Laboratories
LAMP1, Maus	Ratte, monoclonal, 1D4B	Hybridoma Medium	Hybridoma Bank, Iowa, USA (Kasper et al., 1996)
LAMP2, Maus	Ratte, monoklonal, ABL93	Hybridoma Medium	Hybridoma Bank, Iowa, USA (Kasper et al., 1996)
MPR46, human	10C6	Aszites, affinitätsgereinigt	
SNAP29	Kaninchen	Serum	R. Jahn
Syntaxin 6	Maus		Transduction Laboratories
Syntaxin 7	Kaninchen	Serum	R. Jahn
Syntaxin 8	Kaninchen	Serum	G. Fischer von Mollard
Syntaxin 13	Kaninchen	affinitätsgereinigt	R. Jahn

Antigen	Immunisierte Spezies	Aufarbeitung	Referenz
Syntaxin 16	Kaninchen	Serum	G. Fischer von Mollard
VAMP4	Kaninchen	Serum	G. Fischer von Mollard
Vti1a	Kaninchen	affinitätsgereinigt	G. Fischer von Mollard
Vti1b	Kaninchen	affinitätsgereinigt	G. Fischer von Mollard

2.1.9.2 Sekundärantikörper

FITC-gekoppelt: Ziege anti Maus, Ziege anti Hase, Ziege anti Ratte, Esel anti Ratte

Texas Red-gekoppelt: Ziege anti Maus, Ziege anti Hase, Esel anti Ziege, Ziege anti Ratte

HRP-konjugiert: Ziege anti Maus, Ziege anti Hase, Ziege anti Ratte

Alle Antikörper wurden von Dianova, Hamburg bezogen.

2.1.10 Säulenfüllmaterial

Protein A Sepharose[®] 4 fast flow Amersham Pharmacia

Protein G Sepharose[®] 4 fast flow Amersham Pharmacia

2.1.11 Vektoren und DNA-Standards

pET-28a in XL1 blue

pGK Hygro

pSHH

DNA-Ladder

Invitrogen life technologies

IMGENEX Corporation

GIBCO/BRL, Eggenstein

2.1.12 Bakterienstämme und verwendete Zelllinien

2.1.12.1 Bakterienstämme

XL1-blue (Genotyp: F⁺:Tn10 *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q Δ (*lacZ*)M15/*recA1 endA1 gyrA96*(NaI^r) *thi hsdR17* (r⁻km⁺k) *supE44 relA1 lac*), Stratagene, Heidelberg

E. coli Stamm BL21-(D3)-RIL (Genotyp: *E. coli* B F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal λ*(DE3) *endA Hte* [*argU ileY leuW Cam*^r]), Stratagene, Heidelberg

2.1.12.2 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
MEF, AB5 (Vti1a/Vti1b-doppeldefizient)	Primäre embryonale Mausfibroblasten	diese Dissertation
MEF, AB7 (Vti1b-defizient)	Primäre embryonale Mausfibroblasten	diese Dissertation
MEF, B1 (Vti1a-heterozygot)	Primäre embryonale Mausfibroblasten	diese Dissertation
MEF, B4 (Vti1a-defizient)	Primäre embryonale Mausfibroblasten	diese Dissertation
MEF, B6 (Wildtyp)	Primäre embryonale Mausfibroblasten	diese Dissertation
MEF, C6 (Endobrevin-defizient)	Primäre embryonale Mausfibroblasten	diese Dissertation
MEF, C7 (Endobrevin/Vti1b-doppeldefizient)	Primäre embryonale Mausfibroblasten	diese Dissertation
MEF, E1 (Wildtyp)	Primäre embryonale Mausfibroblasten	ATLASHKIN, 2002
MEF, E5 (Vti1b-defizient)	Primäre embryonale Mausfibroblasten	ATLASHKIN, 2002
MEF, N4 (Vti1b-heterozygot)	Primäre embryonale Mausfibroblasten	diese Dissertation
MEF, N6 (Endobrevin/Vti1b-doppeldefizient)	Primäre embryonale Mausfibroblasten	diese Dissertation

2.1.13 Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen

10 x PBS:	80 g	NaCl	
	1,6 g	Na ₂ HPO ₄	
			wurden in 800 ml H ₂ O bidest. gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt.
TBS:	10 mM		
	150 mM	NaCl	
50 x TAE:	2 M	Tris-Base	
	100 mM	EDTA	
			wurden mit Eisessig auf pH 8,0 eingestellt.
5 x TBE:	54 g	Tris	
	27,5 g	Borsäure	
	5 ml	0,5 M EDTA	
			wurden in 1 l H ₂ O gelöst.
10% SDS:	10 g	Natriumdodecylsulfat	
			wurden in 100 ml H ₂ O bidest. bei 65°C gelöst und sterilfiltriert.
0,5 M EDTA:	181,1 g	Dinatriummethyldiaminotetraacetat x 2 H ₂ O	
			wurden in 800 ml H ₂ O bidest. gelöst, der pH-Wert mit 20 g NaOH oder konzentrierter Natronlauge auf pH 8,0 eingestellt, das Volumen auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert
10 x TE:	100 mM	Tris-HCl (pH 7,6)	
	10 mM	EDTA	

1 M Tris-HCl:	121,1 g	Tris	wurden in 800 ml H ₂ O bidest. gelöst, der pH-Wert mit konzentrierter HCl auf den gewünschten Wert zwischen 7,2 und 9,0 eingestellt, das Volumen auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.
0,3 M Na-Acetat-Puffer:	17,2 g	Essigsäure (D: 1.05)	wurden mit 800 ml H ₂ O bidest. gemischt, mit NaOH auf den gewünschten pH-Wert eingestellt, und auf 1 l aufgefüllt.
20 x SSC:	175,3 g	NaCl	
	88,2 g	Na-Citrat	wurden in H ₂ O bidest. gelöst, der pH-Wert auf pH 7,0 eingestellt, und das Volumen auf 1 l aufgefüllt.
Phenol:			250 g kristallines Phenol, bei 60°C verflüssigt, wurden mit 150 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 ü.N. bei 37°C äquilibriert. Nachdem die untere wässrige Phase verworfen worden war, wurde mit 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 ü.N. bei 4°C inkubiert. Dann wurde die obere wässrige Phase verworfen und das Phenol in Aliquots bei -20°C gelagert.

Alle verwendeten Lösungen wurden nach Vorschriften aus dem Laborhandbuch von SAMBROOK et al. (1989) angesetzt.

2.1.14 Medien zur Anzucht von prokaryonten Zellen

LB-Medium:	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Bacto-Hefe-Extrakt
	5 g	NaCl

wurden in 800 ml H₂O bidest. gelöst, auf pH 7,5 eingestellt, mit H₂O bidest. auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. Das LB-Medium wurde bei 4°C gelagert.

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 15 g Agar pro Liter zugesetzt. Die über 60°C heiße Agarlösung wurde in Petrischalen gegossen und die Agarplatten nach dem Erstarren bei 4°C gelagert.

SOC-Medium:	2 g	Bacto-Trypton
	0,5 g	Bacto-Hefe-Extrakt
	60 mg	NaCl
	10 mg	KCl
	200 mg	MgCl ₂ ·6H ₂ O

wurden in 150 ml Aqua bidest. Gelöst, auf pH 7,5 eingestellt, mit Aqua bidest. Auf 200 ml aufgefüllt und autoklaviert. Das SOC-Medium wurde bei 4°C gelagert.

2.1.15 Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit eukaryonten Zellen

PBS (Zellkultur):	150 mM	NaCl
	120 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
	0,002% (w/v)	Phenolrot

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Seromed/Biochrom, Berlin
Fötale Kälberserum (FKS)	GIBCO/BRL, Eggenstein
L-Glutamin (200 mM)	GIBCO/BRL, Eggenstein
OptiMEM	Life technologies

Trypsin-EDTA-Lösung	GIBCO/BRL, Eggenstein
0,05% (w/v) Trypsin	
0,02% (w/v) EDTA in modifizierter	
Puck`s Salzlösung	
Nicht essentielle Aminosäuren:	
	1,782 g α -Alanin
	2,642 g α -Asparagin
	1,502 g Glycin
	2,302 g α -Prolin
	2,102 g α -Serin in 200 ml dest.
	H ₂ O lösen.
Antibiotika:	
Ampicillin	Serva
Hygromycin	
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
(10 000 U bzw. 10 000 μ g/ml)	

2.1.16 EDV

Hardware:

iMac	Apple Macintosh
Apple Laser Writer 16/600 PS	Apple Macintosh
IBM-kompatibler PC P IV	Microsoft
Scan Jet 4c/T	Hewlett Packard

Software:

Adobe-Photoshop 5.5	Adobe Systems Inc.
Windows 98SE/XP	Microsoft
Word 2000	Microsoft
Windows Excel	Microsoft

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA

Alle folgenden Methoden und Vorschriften wurden, soweit nicht anders angegeben, dem Laborhandbuch „Molecular Cloning“ von SAMBROOK et al., (1989) entnommen.

2.2.1.1 DNA-Präzipitation mit Ethanol

Das Volumen der DNA-Lösung wurde bestimmt und die Konzentration der Kationen mit der angegebenen Salzlösung eingestellt:

	Stammlösung	Endkonzentration
Na-Acetat pH 5,2	3 M	0,3 M

Die DNA-Probe wurde mit 2 Vol. -20°C kaltem Ethanol versetzt und gemischt. Die Präzipitation erfolgte 25 min bei -70°C, 10 min auf Trockeneis oder über Nacht bei -20°C. Die DNA wurde durch 10 minütige Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge pelletiert. Anschließend wurde 1x mit 70%igem Ethanol gewaschen und wiederum 5 min zentrifugiert. Das Präzipitat wurde 3-5 min im Vakuumkonzentrator getrocknet.

2.2.1.2 Extraktion von DNA mit Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol oder Chloroform

Die Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform ist eine Standardmethode zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäure-Präparationen. Phenol und Phenol/Chloroform wurden auch - im Verhältnis 24:1 mit Isoamylalkohol versetzt - verwendet. Die zu extrahierende DNA-Lösung wurde mit einem Volumenteil der vorgenannten Lösungen gut gemischt und 3 min zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde abgenommen und weiterverarbeitet.

2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Photometrische Analyse

Die photometrische Messung von DNA erfolgte bei 260 nm gegen TE oder H₂O in einer Quarzküvette. OD₂₆₀ = 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

2.2.1.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

(LEHRBACH UND FRISCHAUF, 1982)

Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben. Eine Unit entspricht der Menge an Restriktionsenzym, die benötigt wird, um 1 µg Lambda-DNA in einer Stunde vollständig zu schneiden. Um sicherzustellen, dass die Verdauung quantitativ abläuft, wurden die Enzymmenge und die Inkubationszeit verdoppelt. Die Verdauung von genomischer DNA erfolgte über Nacht.

Reaktionsansatz:

x µg	DNA
2 µl	geeigneter 10 x Puffer (nach Angaben der Hersteller)
2 U	Restriktionsendonuklease
ad 20 µl	H ₂ O

Der Ansatz wurde 2 Std. bei 37°C inkubiert, anschließend wurde ein Aliquot im Agarosegel analysiert. Präparative Verdauungen wurden in größeren Volumina und mit entsprechend größerer Enzymmenge durchgeführt.

Als Reaktionspuffer wurde das Gibco BRL REact™ oder das New England Biolabs (NEB) Puffer-System verwendet. Diese Puffer werden von den Herstellern zusammen mit den Enzymen geliefert. Das REact™ System besteht aus 11 verschiedenen

REact™ Puffern; die vier sogenannten Basispuffer bestehen aus folgenden Komponenten:

REact™ 1: 50 mM Tris/HCl (pH 8) + 10 mM MgCl₂

REact™ 2: 50 mM Tris/HCl (pH 8) + 10 mM MgCl₂ + 50 mM NaCl

REact™ 3: 50 mM Tris/HCl (pH 8) + 10 mM MgCl₂ + 100 mM NaCl

REact™ 4: 20 mM Tris/HCl (pH 7) + 5 mM MgCl₂ + 50 mM KCl

Das NEB System besteht neben enzyspezifischen Puffern ebenfalls aus vier Basispuffern:

NEB 1: 10 mM Tris/HCl (pH 7) + 10 mM MgCl₂ + 1 mM DTT

NEB 2: 10 mM Tris/HCl (pH 8) + 10 mM MgCl₂ + 1 mM DTT + 50 mM NaCl

NEB 3: 50 mM Tris/HCl (pH 8) + 10 mM MgCl₂ + 1 mM DTT + 100 mM NaCl

NEB 4: 20 mM Tris/HCl (pH 8) + 10 mM MgAc₂ + 1 mM DTT + 50 mM KAc

Alle angegebenen Konzentrationen sind 1 x Konzentrationen; die Puffer wurden in 10 x Konzentrationen geliefert.

2.2.1.5 Ligation von DNA-Doppelstrang-Fragmenten

Bei der Ligasereaktion werden DNA-Enden miteinander verknüpft. Hierbei gibt es zwei verschiedene Fälle zu unterscheiden:

Die DNA-Fragmente, die miteinander verknüpft werden sollen, besitzen an ihren Enden kurze, überhängende Einzelstrangbereiche, die zueinander vollständig komplementär sind („cohesive“ oder „sticky ends“).

Die beiden Stränge sind bis zu den Enden basengepaart, d.h. gleich lang, so dass stumpfe Enden entstehen („blunt ends“).

Das verwendete Enzym für die Ligasereaktion ist meistens die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (T4-DNA-Ligase), da sie im Gegensatz zur *E. coli*-DNA-Ligase sowohl überhängende Enden als auch stumpfe Enden ligieren kann. Notwendiger Kofaktor für die Reaktion ist bei der T4-DNA-Ligase ATP.

Für die Ligation ist es notwendig, dass zumindest eines der beteiligten 5'-Enden eine Phosphatgruppe trägt. Dies ist z.B. der Fall, wenn man die Fragmente durch Restriktionsspaltung erzeugt hat. Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einer benachbarten 3'-Hydroxylgruppe in der DNA. Während das Temperaturoptimum für die T4-DNA-Ligase

bei 37°C liegt, weshalb „blunt-end“-Ligationen bei dieser Temperatur inkubiert werden, kann es für „sticky-end“-Ligationen hilfreich sein, die Reaktion bei 16°C zu inkubieren, da dadurch die Hybridisierung der Enden verbessert wird.

Für die Konstruktion eines rekombinanten Plasmides werden zwischen 20 und 100 ng linearisierte Vektor-DNA und ein ca. 10-facher molarer Überschuss an zu integrierendem Insert eingesetzt.

Ligationsansatz:

x µl linearisierte Vektor-DNA
y µl Insert-DNA (ca. 10-fach mehr Insert-DNA als Vektor-DNA)
1,5 µl 10x Ligasepuffer
1,0 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl)
mit ddH₂O auf 15 µl auffüllen.

-> Inkubation üN im Wasserbad bei 16°C.

Danach können die Ansätze direkt zur Transformation von kompetenten *E. coli* eingesetzt werden.

2.2.2 Isolierung von DNA

2.2.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA (Alkalische Lyse)

(modifiziert nach BIRNBOIM und DOLY, 1979)

Eine Plasmid-Minipräparation wird meist in Kombination mit einem anschließenden Restriktionsverdau zur Fragmentlängen-Charakterisierung angewendet, um die aus einer Transformation gewonnenen Klone zu testen. Bei der Minipräparation von Plasmid-DNA wird die chromosomale DNA durch Alkalibehandlung mit NaOH denaturiert und nach anschließender Neutralisierung ausgefällt. Die zirkuläre Plasmid-DNA denaturiert zunächst ebenfalls, renaturiert aber unter hohen Salzkonzentrationen wieder vollständig und bleibt daher gelöst. Durch Zugabe von SDS und einer nachfolgenden Zentrifugation werden die chromosomale DNA, ein großer Teil der RNA und die Proteine sedimentiert. Die Plasmid-DNA im Überstand wird daraufhin mit 100 % Ethanol präzipitiert und durch

einen anschließenden Waschschrift mit 70 %igem Ethanol von Salz befreit. Anwesende RNAs werden durch RNase A-Behandlung gespalten.

Prozedur:

Rekombinante Einzelkolonien wurden in 2 ml 2xYT+Amp in sterilen Reagenzglasern angeimpft und üN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden jeweils 1,5 ml (die restlichen 0.5 ml wurden aufgehoben und dienten der Sicherung der Klone) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei RT mit 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 100 µl „Lysozyme-Lösung“ resuspendiert, wodurch die Zellen lysierten. Anschließend wurden jeweils 200 µl NaOH-SDS hinzugegeben und die Reaktionsgefäße vorsichtig durch Umdrehen gemischt. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei RT. Nun wurden 150 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) hinzugegeben und die Ansätze erneut vorsichtig durch Umdrehen gemischt. Es folgte eine weitere Inkubation für 5 min bei RT. Danach wurden die Ansätze für 9 min bei RT mit 13000 UpM zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt. [Zur Herstellung besonders reiner Plasmid-DNA wurde dieser Überstand nun mit 150 µl eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) versetzt, gut gemischt und für 5 min bei RT mit 13000 UpM zentrifugiert. Die obere Phase wurde weiterverwendet]. Der klare Überstand wurde nun mit 875 µl 100 % Ethanol (unvergällt, -20°C) versetzt und durchgemischt. Die Ansätze wurden nun für 10 min bei 4°C mit 13000 UpM zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets mit 500 µl 70 % Ethanol (-20°C) versetzt und einmal vorsichtig umgedreht. Anschließend wurden die Ansätze für 1 min bei 4°C und 13000 UpM zentrifugiert, die Überstände erneut verworfen und die Pellets ca. 30 min im 37°C-Schrank getrocknet. Danach wurden die Pellets in je 20 µl TE/RNase (100 µg/ml) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung (z.B. Restriktionsverdau) bei -20°C gelagert.

„Lysozyme-Lösung“:

für 100 ml

	93,7 ml ddH ₂ O
50 mM Glukose	1,8 ml 2,78 M (50%) Glukose
10 mM EDTA	2,0 ml 0.5 M EDTA
25 mM Tris-HCl, pH 8,0	2,5 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0
Lagerung bei 4°C	

<u>NaOH-SDS :</u>	<u>für 10 ml</u>
	8,6 ml ddH ₂ O
0,2 M NaOH	0,4 ml 5 M NaOH
1 % (w/v) SDS	1,0 ml 10 % (w/v) SDS
Lagerung bei RT	

RNase A- Stammlösung (10 mg/ml):

10 mg RNase A in 1 ml TE lösen. 30 min bei 95°C inkubieren.

Lagerung bei -20°C

TE/RNase (100µg/ml):

5 µl 10 mg/ml RNase A-Stammlösung auf 500 µl TE.

Lagerung bei 4°C

Zur Präparation besonders reiner Plasmid-DNA z.B. für eine nachfolgende Sequenzierung wurde das Qiaprep-Spin-Miniprep-Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet.

2.2.2.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA (Qiagen Methode)

(Qiagen-Handbuch April 1997)

Plasmidpräparationen wurden nach Vorschrift des Herstellers Qiagen und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt.

P 1:	50 mM	Tris/HCl; pH 8,0
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
P 2:	0,2 M	NaOH
	1%	SDS
P 3:	3 M	Kaliumacetat (KAc) pH 5,5

QBT-Puffer:	750 mM	NaCl
	50 mM	MOPS; pH 7,0
	15%	Ethanol
	0,15%	Triton X-100
QC-Puffer:	1.0 M	NaCl
	50 mM	MOPS; pH 7,0
	15%	Ethanol
QF-Puffer:	1,25 M	NaCl
	50 mM	Tris/HCl; pH 8,5
	15%	Ethanol

Es wurden 100 ml einer Bakterienkultur mit einer OD_{600} von größer als 1 bei 8500 x g im JA-10 Rotor (800 UpM) abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml P 1 resuspendiert, in JA-20 Röhrchen überführt, mit 4 ml P 2 versetzt, vorsichtig durch Rollen gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml kaltem P 3 wurde neutralisiert und anschließend 10-15 min auf Eis inkubiert.

Die Suspension wurde 30 min in einem JA 20-Rotor (Beckman) bei 18.000 UpM zentrifugiert (4°C), der Überstand durch 2 Lagen Mull auf eine mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-100-Säule gegeben. Die Plasmid-DNA bindet an das Silikagel-Anionenaustauscher-Säulenmaterial.

Die Säule wurde zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen; die Plasmid-DNA anschließend mit 5 ml QF-Puffer eluiert und in einem 50-ml-Röhrchen aufgefangen. Die DNA wurde mit 0.7 Vol. Isopropanol gefällt und bei 5.000 UpM (4°C) in der Labofuge für mindestens 45 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen H_2O aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde durch eine OD_{260} -Messung bestimmt und eine Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden Agarosegele verwendet. Die für die Gele benutzte Konzentration an Agarose richtete sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente:

Agarosekonzentration (%)	Trennbereich (kb)
0,6	20 - 1
0,9	7 - 0,5
1,2	6 - 0,4
1,5	4 - 0,2
2,0	3 - 0,1

Proben-Puffer (LP IV):	0,25% (w/v)	Bromphenolblau
40% (w/v)	Saccharose in 1 X TAE	
Ficoll-Marker:	0,25%	Bromphenolblau
0,25%	Xylencyanol	
12,5%	Ficoll Typ 400 in H ₂ O	

Die erforderliche Agarose-Menge wurde in 300 ml 1x TAE aufgeköcht (Mikrowelle) und nach Abkühlen auf 55°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Die Agarose wurde in eine Gelform gegossen und bei RT abgekühlt. Das erstarrte Gel wurde in die Elektrophoresekammer überführt, die Proben wurden mit 10-20% Ficoll-Marker versetzt und in die vorgeformten Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 3-4 V/cm durchgeführt. Durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid werden die DNA-Fragmente unter UV-Licht als Banden sichtbar und das Gel konnte auf dem UV-Transilluminator analysiert werden. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator mit einem Videosystem aufgenommen und ein Ausdruck des Bildes erstellt.

2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Qiagen-Methode)

(Qiagen Handbuch, April 1997)

Lösungen: Der Inhalt der Puffer wird von Qiagen nicht angegeben.

Die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht (UV-Handlampe) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und das Gelstück gewogen. Nach Zugabe von 3 Volumen QX1-Puffer wurde die Agarose durch Inkubation von 10 min bei 50°C aufgelöst. 1 Volumen Isopropanol wurde hinzugefügt und die Lösung auf eine QIAquick Zentrifugationssäule aufgebracht und für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Die DNA bindet an die Säule. Die Säule wird mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen und durch Zentrifugation getrocknet. Die Elution erfolgte mit 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5.

2.2.5 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

2.2.5.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Glycerin-Puffer:	15%(v/v)	Glycerin (autoklavieren)
------------------	----------	-----------------------------

Zur Einschleusung fremder Plasmid-DNA in *E. coli* (COHEN et al., 1972) müssen Bakterien entsprechend vorbereitet werden. Dazu wurden die Zellen ohne die Verwendung von Kationen für die Elektroporation vorbereitet.

Für die Elektroporation wurden 10 ml einer Bakterienkultur in LB-Medium über Nacht wachsen gelassen. Die Übernachtskultur wurde in 1 l LB-Medium gegeben und bei 37°C zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,35 wachsen gelassen. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C vorgenommen. Nach Zentrifugation (JA-10, 5000 UpM, 15 min) wurde das Zellsediment vorsichtig in 1 l eiskaltem Aqua.dest. resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Das Pellet wurde dann in 20 ml eiskaltem 10%igen Glycerol aufgenommen und in einem JA-20 Rotor 15 min bei

6000UpM und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 2 ml 10%igem Glycerol resuspendiert. Für die Lagerung bei –80°C wurden die Zellen à 40 µl aliquotiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren.

2.2.5.2 Transformation von *E. coli* Zellen durch Elektroporation

Für die Transformation wurden 40 µl der elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 50-80 ng DNA des Ligationsansatzes versetzt und vorsichtig gemischt. Dieser Ansatz wurde in eine sterile, eiskalte Elektroporationsküvette überführt und bei einer Einstellung von 1800 V und 25 mF im Elektroporator (Stratagene 1000) sofort elektroporiert. Die so behandelten Zellen wurden mit 500 µl SOC- Medium vorsichtig gemischt, eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert, auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert.

2.2.5.3 Anlegen von Bakteriendauerkulturen

Hierzu wurden mehrere Zahnstocherspitzen einer frisch auf einer LB_{Amp}- bzw. LB_{Kana}-Platte hochgewachsenen Kultur in einem Einfrier-Eppendorf-Gefäß mit 0.7 % DMSO in sterilem Wasser vermischt und anschließend bei –80°C eingefroren. Die Bakterien können so über mehrere Jahre konserviert werden.

2.2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

(MULLIS und FALOONA, 1987)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (englisch: *polymerase chain reaction*, PCR) ist eine sehr effektive Methode, um *in vitro* große Mengen einer spezifischen DNA-Sequenz (Template) zu amplifizieren. Die Vervielfältigung der DNA-Sequenz erreicht man durch einen dreistufigen zyklischen Prozess. Notwendige Voraussetzungen für die PCR sind:

1) Zwei synthetische Oligonukleotidprimer, die zu Regionen auf einander gegenüberliegenden Strängen komplementär sind, welche die gesuchte DNA-Sequenz flankieren. Die freien 3'-OH-Gruppen der Oligonukleotidprimer sind nach der Anlagerung an diese Bereiche der Ausgangs-DNA einander zugewandt und dienen als Startpunkt für eine DNA-Polymerase-Reaktion. Die DNA-Polymerase verknüpft die OH-Gruppe durch eine Phosphodiesterbindung mit einem freien Nukleotid, wodurch der Primerstrang in 3'-Richtung verlängert wird. Die Primer sollten ca. 20 - 30 Nukleotide lang sein, einen möglichst hohen GC-Gehalt besitzen (40 - 60 %) und am 3'-Ende mit einem C oder G enden. Außerdem sollten beide Primer eine ähnliche Schmelztemperatur (T_m = Temperatur, bei der unter den Pufferbedingungen 50 % der Oligonukleotide dissoziieren) von mindestens 55°C besitzen, welche nach folgender Formel berechnet werden kann. Hierbei werden nur die zur Matrizen-DNA komplementären Nukleotide berücksichtigt.

$$T_m = 69.3 + 0.41 * (G + C [\%]) - 650 / \text{Primerlänge } [^{\circ}\text{C}]$$

näherungsweise:

$$T_m = 4 * \text{Anzahl der G/C-Basen} + 2 * \text{Anzahl der A/T-Basen } [^{\circ}\text{C}]$$

Die Annealing-Temperatur liegt im allgemeinen 3 - 4°C unterhalb der berechneten T_m . Je höher die Annealing-Temperatur, desto spezifischer erfolgt die Hybridisierung der Primer mit dem DNA-Template.

2) Geringe Mengen einer DNA-Probe mit einer Zielsequenz, die zwischen dem Primerpaar liegt und 100 bis 5000 bp lang ist.

3) Eine thermostabile DNA-Polymerase, die eine Temperatur von 95°C oder mehr standhält. Hierzu wird zumeist die DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) eingesetzt. Da diese Polymerase jedoch keine Korrekturlesefunktion („proof-reading“) besitzt, wird häufig zur Optimierung der Amplifikationsgenauigkeit Pfu-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* im Verhältnis Taq:Pfu = 10:1 hinzugefügt.

4) Die 4 Desoxyribonukleotide (dNTPs).

Ein typischer PCR-Prozeß zur Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz erfordert mehrere Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei aufeinanderfolgenden Schritten:

1. Denaturierung:

Der erste Schritt bei der DNA-Amplifikation ist die thermische Denaturierung der DNA-Probe durch Erhöhung der Temperatur im Reaktionsgefäß auf 95°C, wobei sich die beiden DNA-Doppelstränge voneinander trennen. Das Reaktionsgemisch enthält zusätzlich zur Ausgangs-DNA einen beträchtlichen molaren Überschuss an beiden Oligonukleotidprimern, die *Taq*-Polymerase und die vier Desoxyribonukleotide.

2. Renaturierung („Annealing“):

Für den zweiten Schritt lässt man die Temperatur auf ungefähr 55°C absinken. Während der Temperatursenkung paaren die Primer mit komplementären Sequenzen in der DNA-Probe. Die effektive Stringenz des Annealing-Schrittes kann durch Zugabe von Denaturierungsmitteln wie DMSO zum PCR-Ansatz erhöht werden.

3. Synthese (Elongation):

Bei dem dritten Schritt liegt die Temperatur bei 72°C, dem optimalen Bereich für die katalytische Funktion der *Taq*-Polymerase. Die DNA-Synthese beginnt an den 3'-OH-Enden der Primer. Die *Taq*-Polymerase verlängert in Gegenwart von dNTPs die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert so neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zum Template ist. Hierbei amplifiziert die *Taq*-Polymerase in etwa 1 kb DNA pro Minute.

Jede zusätzliche Strangsynthese bedeutet eine neue Vermehrungsrunde, wobei auch die neusynthetisierten DNA-Stränge als Matrize dienen. So steigt mit jedem neuen Zyklus die Konzentration der amplifizierten Ziel-Sequenzen exponentiell an. Die optimalen Reaktionsbedingungen müssen für jeden Ansatz individuell ermittelt werden. Besonders die MgCl₂-Konzentration und die Annealing-Temperatur müssen optimiert werden.

Beispiel: PCR für die Klonierung eines Fragmentes in einen VektorPCR-Ansatz:

10 µl	10x Taq-Puffer (100mM Tris/HCL pH 9.0; 500 mM KCl)
10 µl	2.5 mM dNTPs (Amersham, Stock 100mM)
5 µl	25 mM MgCl ₂
2 µl	5'-Primer (Stock 100 pmol/µl)
2 µl	3'-Primer (Stock 100 pmol/µl)
Rest in Pipettenspitze	DNA-Template (Plasmid-Miniprep-DNA)
1 µl	Taq-Polymerase + 1/10 Pfu-Polymerase (für analytische PCR wird nur Taq-Polymerase verwendet)
ad 100 µl	HPLC-H ₂ O

Temperaturprogramm:

40 sec	95°C
40 sec	50°C (hängt von Primern ab)
1 min	72°C (Dauer hängt von der Länge des Templates ab)
30 Zyklen	

Die Reaktion erfolgte in dünnwandigen 0.5 ml Reaktionsgefäßen in einem automatischen Thermocycler mit beheizbarem Deckel. Die Amplifikationsprodukte konnten daraufhin durch TAE-Agarose-Gelelektrophorese analysiert werden. Wenn das PCR-Produkt danach einer Restriktionsspaltung unterzogen werden soll, um es anschließend in einen Vektor zu klonieren, müssen zuvor die Primer durch Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation entfernt werden.

2.2.7 Klonierung von SNAP29 RNAi-Konstrukten und Etablierung von RNAi MEF-Zelllinien

Um die Expression von SNAP 29 in Maus-embryonalen Fibroblasten zu unterdrücken wurde ein auf Plasmid-Technik basierendes System für RNA Interferenz (RNAi) von GeneSilencer benutzt. Inserts, die in den GeneSilencer-Vektor pSHH kloniert werden,

exprimieren siRNAs mit Hilfe des U6 Promotors in transfizierten Säugerzellen. Die Oligonukleotide wurden wie folgt konstruiert: Die Zielregion von SNAP29 mRNA in direkter und reverser Orientierung wurden durch eine kurze Schleifensequenz voneinander getrennt (BRUMMELKAMP et al., 2002). Ein Überhang von 4 Nukleotiden für die Ligation mit Sall/XhoI-Schnittstellen und TTTTT als Terminator der Transkription wurden ans 5'- bzw. 3'-Ende des Oligonukleotids für den kodierenden Strang hinzugefügt. Ans 5'-Ende des Oligonukleotids für den komplementären Strang wurde vor AAAAA ein Überhang für die Ligation mit XbaI angefügt.

Konstrukte:

Spezifisches Oligonukleotid	Orientierung	Sequenz (5'-3')
allgemein (kodierend)	5'	TCGAG N ₁₉ TTCAAGAGA N ₁₉ R TTTTT
allgemein	3'	CTAGAAAAA N ₁₉ TCTCTTGAA N ₁₉ R C
RNAi von SNAP29 a	5'	TCGAG AGAAGATCGGAGTCGCCTC TTCAAGAGA GAGGCGACTCCGATCTTCT TTTTT
RNAi von SNAP29 a	3'	CTAGAAAAA AGAAGATCGGAGTCGCCTC TCTCTTGAA GAGGCGACTCCGATCTTCT C
RNAi von SNAP29 b	5'	TCGAG TACCCAAAGAACTCGACCC TTCAAGAGA GGGTCGAGTTCTTTGGGTA TTTTT
RNAi von SNAP29 b	3'	CTAGAAAAA TACCCAAAGAACTCGACCC TCTCTTGAA GGGTCGAGTTCTTTGGGTA C

Die Oligonukleotide wurden 10 min bei 95°C erhitzt und für die korrekte Anlagerung (Annealing) 65 min lang je ein Grad pro Minute, also auf 30°C, heruntergekühlt. Die resultierenden Produkte wurden mit dem linearisierten Vektor pSHH ligiert, sequenziert und in Maus-embryonale Fibroblasten, nach dem Originalprotokoll von Effectene

transfiziert (3µg DNA aufgefüllt auf 150µl EC-Puffer, 8µl Enhancer, 25 µl Effectene Reagenz; alles zu 1 ml Medium geben, mischen, auf $3,5 \times 10^5$ Zellen geben). Vom Vektor pGK Hygro wurden 0,3 µg DNA kotransfiziert, da sowohl der Vektor pSHH als auch die zu transfizierenden Vti1b-defizienten Zellen Neomycin-Resistenz aufweisen. Klone, die für bis zu 400 µg/ml Hygromycin resistent waren, wurden gepickt und für weitere Analysen kultiviert. Eine Abnahme der Expression von SNAP29 wurde mittels Immunoblottings getestet.

2.2.8 Sequenzierung

Die Sequenzanalyse von DNA-Fragmenten erfolgte nach dem Prinzip von (SANGER et al., 1977) mittels einer Kapillarelektrophorese in einem Sequenzierautomaten Typ 310 der Firma PE Biosystems, Norwalk/USA. Hierzu wurde das Kit ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction verwendet.

Vorbereitung:

Zuerst muss die Plasmid-DNA, in welcher die zu sequenzierende DNA als Insert vorliegt, mit dem QIAprep-Spin-Miniprep-Kit der Firma Qiagen aufgereinigt werden. Danach wird die Plasmid-DNA einer PCR-Reaktion unterzogen, wobei die Template-DNA unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Basen amplifiziert wird. Als Sequenzierungs-Primer dienten Abschnitte auf den jeweiligen Vektoren, die in der Nähe der Insertionsstelle lagen (z.B. T3, T7).

PCR-Ansatz:

vorwärts-Reaktion

- x µl Plasmid-DNA (0.2 – 0.5 µg)
- 3.2 µl vorwärts-Primer (1 pmol/µl)
- 2.0 µl ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Premix
- x µl HPLC-H₂O (ad 20 µl)

rückwärts-Reaktion

- x µl Plasmid-DNA (0.2 – 0.5 µg)
- 3.2 µl rückwärts-Primer (1 pmol/µl)
- 2.0 µl ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Premix

x μ l HPLC-H₂O (ad 20 μ l)

Temperaturprogramm:

$96^{\circ}\text{C} \Rightarrow 10 \text{ sec}$
 $50^{\circ}\text{C} \Rightarrow 5 \text{ sec}$
 $60^{\circ}\text{C} \Rightarrow 4 \text{ min}$ } 25x

Aufreinigung der DNA:

Nach der Sequenzreaktion mussten die nicht eingebauten, fluoreszenzmarkierten ddNTPs durch eine Ethanol-fällung entfernt werden. Hierzu wurden in ein 500 μ l Eppendorf-Gefäß 2 μ l 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 50 μ l 95 % EtOH (RT) vorgelegt. Der PCR-Ansatz wurde hinzupipettiert, gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13000 UpM und RT. Das Pellet wurde mit 250 μ l 70 % EtOH (RT) vorsichtig gewaschen. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 UpM und RT wurde das Pellet für mindestens 30 min im 37°C-Schrank getrocknet. Anschließend wurde es in 25 μ l HPLC-H₂O resuspendiert und konnte nun im Sequenzierautomaten kapillarelektrophoretisch analysiert werden.

2.3 Expression von Proteinen und Gewinnung eines Antiserums

2.3.1 Induktion von *E. coli* mit IPTG

IPTG: 0,1 M In ddH₂O, sterilfiltriert

Der *E. coli* BL21-Stamm pBK103 wurde üN in 25 ml 2xYT mit 50 μ g/ml Kanamycin bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 225 ml 2xYT + Kanamycin hinzugegeben und die Kultur für weitere 1 h 30 min bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 – 0.9 inkubiert. Die Expression des rekombinanten 6xHis-Syntaxin 16-Proteins wurde durch Zugabe von 476 μ l 105 mM IPTG [25 mg in 1 ml ddH₂O, sterilfiltriert] induziert (Endkonz.: 0.2 mM). Es folgte eine Inkubation für 5 h bei 37°C (Temperatur und Induktionszeit für optimale

Expression wurden zuvor in einem Vorversuch ausgetestet). Die Zellen wurden durch 15 min Zentrifugation bei 5000 UpM und 4°C geerntet. Das Pellet wurde in 20 ml 1x PBS resuspendiert und konnte bis zur weiteren Verarbeitung bei –20°C eingefroren werden.

2.3.2 Lyse durch „french press“ (Zellaufschlussverfahren)

Die Lyse von rekombinanten *E. coli* Zellen wurde im „french press“- Verfahren durchgeführt, da dieser Aufschluss durch hohen Druck im Hinblick auf die Vermeidung von Protein-Degradation besonders schonend ist. Eine logarithmisch wachsende Kultur wurde nach dem Waschen in 0.1 M Tris-HCl, pH 7,4 oder 8,0 aufgenommen, mit Proteaseinhibitoren (356 µl PMSF, 4 µl Leupeptin, 40 µl Pepstatin) versetzt und in eine „french press“- Zelle (French[®] Pressure Cell Press, Specronic Instruments, USA) mit einem Fassungsvermögen von 20 ml gefüllt. Ein Druck von maximal 850- bzw. 1200 bar wurde dazu eingestellt und blieb auch beim Öffnen des Auslassventils konstant. Die Zellsuspension wurde zweimal durch die Druckzelle geschickt und das Lysat sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.3.3 Reinigung eines 6HIS-Fusionsproteins

Eine Möglichkeit größere Mengen eines definierten Proteins zu gewinnen, ist die heterologe Überexpression in *E. coli*-Zellen. Dazu wird der Leserahmen für das Protein in einen geeigneten Überexpressionsvektor hinter einen induzierbaren Promotor kloniert. Weiterhin enthält das Plasmid noch Sequenzen für ein Affinitätsepitop, welches die Reinigung des rekombinanten Proteins ermöglichen soll. Das hier verwendete Expressionssystem benutzt einen in WT-*E. coli*-Zellen nicht vorkommenden T7-Promotor zur Expression des Fusionsproteins und das 6xHis-Epitop zur Reinigung. Zur Überexpression wurde der proteasedefiziente *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus(D3)-RIL von Stratagene verwendet, der eine IPTG induzierbare T7-RNA-Polymerase besitzt. IPTG bindet an ein *lac*-Repressorprotein, welches dadurch seine DNA-Bindungseigenschaften verliert und die Transkription eines endogenen *lac*-Promotors nicht mehr inhibiert, der die Expression der T7-RNA-Polymerase kontrolliert. Diese

bindet daraufhin an den T7-Promotor des Expressionsvektors pET-28a, wodurch die Expression des nachgeschalteten rekombinanten Proteins induziert wird.

Die Gensequenz der N-terminalen Domäne von Syntaxin 16 (Aminosäuren 1 – 239) wurde zunächst über eine PCR-Reaktion in den Expressionsvektor pET-28a kloniert, was zur N-terminalen Anfügung einer 6xHis-Sequenz führt (pBK103). Nach Überexpression und Aufschluss der *E. coli*-Zellen wird das Fusionsprotein an einer Epitop-spezifischen Affinitätsmatrix (Ni-NTA-Agarose, Qiagen) gebunden, gewaschen und anschließend in reiner Form eluiert.

Das Lysat wurde nach dem Zellaufschluss für 10 min mit 12000 UpM bei 4°C in einem JA20-Rotor zentrifugiert. Danach wurde das Ni-NTA-Gel mit dem Überstand, welcher das 6xHis-Syntaxin 16-Fusionsprotein enthält, versetzt und für 30 min bei 4°C auf der Wippe inkubiert. Die Lösung wurde danach in eine mit einer Fritte verschlossene Säule gegeben und der Durchlauf (ungebundene Proteine) zur späteren Analyse aufgefangen und weggefroren. Die Säule wurde nun wie folgt gewaschen:

5.0 ml 7.2 M Harnstoff in 1x PBS, pH 7.4

5.0 ml 7.2 M Harnstoff in 0.1 M NaPO₄, pH 7.0

Die Elution erfolgte mit:

1.5 ml 6.4 M Harnstoff in 0.1 M NaPO₄, pH 5.9 -> Eluat 1

2.0 ml 6.4 M Harnstoff in 0.1 M NaPO₄, pH 4.5 -> Eluat 2

Um den Harnstoff zu entfernen wurden die Eluate üN gegen 3 M Harnstoff in 1x PBS und anschließend für 5 h gegen 1x PBS dialysiert.

Die einzelnen Fraktionen wurden zur Analyse in einem 11 %igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde vom Eluat 2 eine Proteinbestimmung durchgeführt. Das Eluat 2 wurde daraufhin Aliquotiert und bei -20°C weggefroren.

2.3.4 Immunisierung der Kaninchen

Zur Gewinnung eines Antiserums gegen Syntaxin 16 wurde ein Kaninchen (New Zealand, white) mit dem in *E. coli* überexprimierten Protein immunisiert. Das mit einem 6HIS-TAG versehene Protein wurde dazu gereinigt. Zur Überprüfung des Reinheitsgrades wurden die Proteinproben nach SDS-PAGE durch Coomassie-Färbung kontrolliert. Die Proteinpräparationen wurden für die Immunisierung verwendet. Für die

Primärinjektionen wurden je 500 µg gereinigtes Protein mit PBS auf ein Endvolumen von 500 µl aufgefüllt und in eine 2 ml Luer-Lock Spritze aufgezogen. In eine entsprechende zweite Spritze wurde das gleiche Volumen von dem Adjuvans (specol) vorgelegt. Zum Mischen von Antigen und Specol wurde eine dünne Plastikcapillare, die an beiden Enden mit Luer-Anschlüssen versehen war, an die Spritzen gekoppelt. Durch das mehrmalige Pressen des Gemisches durch die Kapillare von der einen in die andere Spritze, wurde eine weiße Emulsion hergestellt. Für die Injektion wurde der gesamte frisch emulgierte Ansatz verwendet, wobei dem Kaninchen 1-2 Depots subkutan in die Hautpolster der Hüften injiziert wurden. Drei Wochen nach der Primärinjektion wurde das Antigen erneut verabreicht (300 µg), 14 Tage danach wurde dem Kaninchen Blut entnommen. Weitere Injektionen wurden alle 4 Wochen durchgeführt, wobei die Blutabnahmen jeweils 14 Tage später erfolgten. Serum, das vor der Primärinjektion abgenommen wurde, diente als Präimmunserum in Kontrollexperimenten.

2.3.5 Gewinnung, Aufarbeitung und Lagerung der Seren

Für die Gewinnung des Serums wurde den Kaninchen Blut an der Ohrvene abgenommen. Störende Haare wurden vorsichtig abgezupft und der Venenbereich mit Alkohol desinfiziert. Eine dünne Kanüle, die mit einer Plastikcapillare verbunden war, wurde behutsam in die Vene eingebracht. Es wurden jeweils 20- bis 30 ml Blut abgenommen. Das Blut wurde anschließend üN bei 4°C inkubiert. Durch die sich anschließende Zentrifugation (JA-10, 11000 UpM, 30 min, 4°C) wurde das geronnene Blut abgetrennt, das Blutplasma wurde sofort abgenommen und in Aliquots bei -20°C gelagert.

2.4 Zellbiologische Methoden

Die Zellen wurden in 5%-tiger CO₂-Atmosphäre bei 37°C und 85% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Medien und Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt, wenn nicht anders angegeben.

Es wurde folgendes Medium verwendet:

MEF DMEM + 10% FKS + 1 x Penicillin/Streptomycin

2.4.1 Trypsinieren von Zellen

Trypsin-EDTA-Lösung: 0,05% (w/v) Trypsin
0,05% (w/v) EDTA in modifizierter Puck's Salzlösung

Der Zellrasen wurde mit PBS gespült, um inhibierende Einflüsse von Serumbestandteilen auf die Trypsinaktivität zu verhindern. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen ca. 5 min mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde im inversen Mikroskop kontrolliert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit der Pipette vereinzelt und ggf. die Zellzahl pro Milliliter mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in der gewünschten Dichte auf Kulturplatten ausgesät, bzw. wurde ein Teil der Zellen zur Weiterkultivierung in der Kulturflasche belassen.

2.4.2 Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen

Einfriermedium: 10% DMSO in Zellkulturmedium

Zur Konservierung wurden adhärent wachsende Zellen trypsiniert in Medium aufgenommen und für 5 min bei 1000 x g in der Laborfuge sedimentiert. Nach Absaugen

des Überstandes wurden die Zellen in einer angemessenen Menge Einfriermedium aufgenommen und auf vorgekühlte Einfrierröhrchen verteilt. Die Zellen wurden zunächst bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Revitalisierung wurde das Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank genommen, zunächst für ca. 1 min bei RT angewärmt und anschließend im Ethanolbad bei 37°C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde entnommen, in 3,5 ml kaltes Medium (4°C) überführt und in der Labofuge 5 min bei $1000 \times g$ sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um DMSO-Reste, tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

2.4.3 Präparation von Maus-embryonalen Fibroblasten

Zur Gewinnung von Maus-embryonalen Fibroblasten wurde ein schwangeres Weibchen am Tag 13,5 der Schwangerschaft getötet und ihm der Uterus entnommen. Die Embryonen wurden aus dem Uterus präpariert und in PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Den Embryonen wurden Leber und Köpfe, für eine anschließende Genotypisierung, entfernt. Die Reste jedes Embryos wurden zerschnitten und in je einen 25 ml Erlenmeyerkolben pro Embryo überführt. Dieser Erlenmeyerkolben enthielt Glaskugeln und 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (GIBCO). Die embryonalen Gewebe wurden nun mittels Schütteln für 15 min bei 37°C aus ihrem Verband gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 ml DMEM gestoppt und durch hoch- und runterpipettieren eine Zellsuspension gewonnen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert, in 10 ml DMEM resuspendiert und auf 10 cm Kulturschalen ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie geteilt. Ein Teil wurde eingefroren, der Rest wurde in Kultur behalten um stabile Zelllinien zu etablieren.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Proteinbestimmung nach BioRad

(BRADFORD, 1976)

Reagenz: BIO-RAD Dye Reagent Concentrate

Als Standard zur Erstellung einer Eichgeraden wurde eine BSA-Lösung von 1 mg/ml in TBS verwendet. Davon wurden 10, 20, 50, 100, 200 µl eingesetzt sowie ein Leerwert ohne Protein pipettiert. Die Proben sowie die Standardreihe wurden mit ddH₂O auf 800 µl aufgefüllt. Dann wurden 200 µl Reagenz zugegeben und gemischt. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand der Eichgeraden aus den Standardwerten.

2.5.2 Indirekte Immunfluoreszenz (Permeabilisierung durch Triton)

Lösungen:

PBS:	16 mM Na ₂ HPO ₄ , 4 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl
PBS/PFA:	3% Paraformaldehyd in PBS (w/v)
PBS/NH ₄ Cl:	50 mM NH ₄ Cl in PBS
PBS/Triton:	0,05% Triton X-100 in PBS
PBS/BSA:	1% BSA in PBS

Fixierung und Permeabilisierung:

Die Zellen wurden 50–70% konfluent auf runden Deckgläsern in 24-well-Platten ausgesät und über 1–2 Tage wachsen gelassen. Vor der Fixierung wurden die Zellen 1x mit PBS gespült und mit 3% PFA in PBS für 30 min bei RT fixiert. Die Zellen wurden nach der Fixierung 2x mit PBS gespült und dann 10 min mit 50 mM NH₄Cl in PBS

inkubiert um überschüssiges Aldehyd zu blockieren. Die Ammoniumchloridlösung wurde durch zweimaliges Spülen mit PBS entfernt. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch 2 x 5 minütige Inkubation mit 0,05% Triton X-100 in PBS. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurden die Zellen 15 min mit 1% BSA in PBS behandelt.

Bindung der Antikörper:

Alle Antikörper wurden in 1% BSA in PBS verdünnt. 15 µl der Antikörperverdünnung wurden als Tropfen auf einen Streifen Parafilm pipettiert und die Deckgläser mit den Zellen nach unten auf den Tropfen gelegt. Um die Zellen vor dem Austrocknen zu schützen, diente ein mit feuchtem Zellstoff ausgelegter luftdichter Behälter als Aufbewahrungsort während der einstündigen Inkubationszeit. Anschließend wurden die Deckgläser mit den Zellen nach oben wieder in die 24-well Schalen überführt und dreimal 5 min mit 250 µl PBS gespült. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde mit 250 µl Ziegen Serum (10% in PBS) 20 min blockiert. Die Bindung der fluoreszierenden Sekundärantikörper (Verdünnung 1:200) erfolgte, wie für die Erstantikörper beschrieben, für eine Stunde bei RT unter Lichtabschluß, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen fünfmal mit 250 µl PBS und zweimal kurz mit 250 µl A.dest. gespült. Die Immunfluoreszenzpräparate wurden in DAKO[®] Medium eingebettet, um das schnelle Ausbleichen durch Oxidation zu verhindern. Nach Polymerisation des DAKO[®] Medium wurden die Präparate bei 4°C unter Lichtausschluß gelagert. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Lasermikroskop. Doppelimmunfluoreszenzen erfolgten mittels simultaner indirekter Immunfluoreszenz. Da die Antikörper aus unterschiedlichen Spezies stammen, konnten durch geeignete Kombination und entsprechende Wahl der Sekundärantikörper diese zugleich dargestellt werden.

Die Auswertung erfolgte am konfokalen Lasermikroskop.

2.5.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Das Prinzip der Laser-Scanning-Mikroskopie beruht darauf, daß einzelne fluoreszierende Punkte im Präparat in den Fokus eines Lasers gebracht werden und diese so mit einer hohen Energie angeregt werden. Der Laser wird auf eine Ebene (z-Ebene) im Präparat

fokussiert. Durch die Ablenkung des Lasers in der x- und y- Ebene können mittels eines Spiegels schrittweise dicht nebeneinanderliegende Punkte im Präparat angeregt werden. Auf diese Weise wird eine definierte Ebene im Präparat abgetastet. Das vom fluoreszierenden Präparat emittierte Licht fällt durch das Objektiv des Mikroskops und durch eine dem Photodetektor vorgeschaltete Lochblende (Pinhole) mit veränderbarer Größe. Das Schließen dieser Lochblende bewirkt, daß nur solche Bildpunkte auf dem Detektor abgebildet werden, die in der Fokusebene des Lasers (bzw. des Objektivs) liegen, also konfokale Bilder erzeugt werden können. Die entstehenden Bilder werden in einem internen Computer digitalisiert und auf einem hochauflösenden Bildschirm dargestellt. Die Bilder werden in Form von Bilddateien im TIF-Format abgespeichert.

2.5.4 TCA-Präzipitation von Proteinen

Lösungen:

50% Trichloressigsäure (TCA)

Aceton

2 x Probenpuffer

Bei einer TCA-Fällung werden Proteine in eine TCA unlösliche Form überführt. Durch Aufnahme des Pellets in adäquat verringerter Menge Probenpuffers konnten die Proteine so konzentriert werden, daß auch geringe Proteinmengen eventuell nachweisbar wurden. Die Proteinlösung wurde 1:10 mit 50 % iger TCA-Lösung gemischt. Die Endkonzentration von TCA betrug also 5 %. Die Proben wurden dann 10 min auf Eis gelagert und anschließend fünf min bei 13000 UpM in einer Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 500 µl Aceton gewaschen um Reste der Säure zu entfernen. Das Pellet wurde getrocknet und die gewünschte Menge 2 x Probenpuffer wurde hinzugefügt. Durch starkes Vortexen, fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C und erneutes starkes Vortexen wurden die gefällten Proteine wieder in Lösung gebracht.

2.5.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(LAEMMLI et al., 1970)

Lösungen:

Trenngelpuffer:	1,5 M	Tris-HCl pH 8,8
Sammelpuffer:	1M	Tris-HCl pH 6,8
Acrylamidlösung:	30%	Acrylamid
	0,8%	Bis
APS:	10%	APS
SDS:	10%	SDS
1 x Laufpuffer:	3,02 g	Tris-HCl pH 8,8
	14,4 g	Glycin
	1 g	SDS
3 x Probenpuffer	4,5 g	SDS
	18,8 ml	1 M Tris-HCl pH 6,8
	15 g	Saccharose
	1 Spatelspitze	Bromphenolblau
	5 ml	Mercaptoethanol
	36,2 ml	Aqua dest.

Ansatz:

	Trenngel 8% / 12,5%	Sammelgel
Acrylamidlösung (ml)	4,0 ml / 6,25 ml	1,39 ml
Trenngelpuffer (ml)	3,75 ml	-
Sammelgelpuffer (ml)	-	936 µl
10% SDS (µl)	150	75
10% APS (µl)	150	150
TEMED (µl)	7,5	7,5
A. dest.	6,9 ml / 4,65 ml	4,95 ml

Die Elektrophorese wurde in einem System mit vertikal ausgerichteten Platten durchgeführt, dessen Kanten vor dem Eingießen des Gels mit 1% Agarose in Wasser abgedichtet wurden. Das frisch gemischte Trenngel wurde zwischen die Glasplatten gegossen und sofort mit 0,1% SDS überschichtet. Die Geldicke betrug 1 mm. Zur vollständigen Polymerisation des Gels wurde es über Nacht bei 4 °C gelagert. Nachdem die SDS-Lösung entfernt und die Trenngeloberfläche mit Wasser gespült wurde, wurde das Sammelgel eingegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nach 20 min Polymerisation wurde der Probenkamm entfernt, die Probenaschen mit Wasser gespült und Gelreste aus den Taschen entfernt. Die Proben wurden 2:1 mit Probenpuffer gemischt, 5 min bei 95°C denaturiert, aufgetragen und mit Lauffpuffer überschichtet. Als Marker wurden 5 µl Calbiochem Rainbow-Marker aufgetragen. In die leeren Probenaschen wurde 1 x Probenpuffer gegeben, der entsprechend aus 3 x Probenpuffer verdünnt wurde. Die Elektrophorese erfolgte mit 30 mA bei RT in 1-2 Stunden. Ein Ventilator wurde zur Kühlung eingesetzt.

Kurz vor Herauslaufen der unteren Lauffront wurde die Elektrophorese beendet und das Gel für Western-Blot, Silberfärbung oder Coomassiefärbung verwendet.

2.5.6 Western-Blot-Analyse

Der Westernblot ist ein Verfahren, mit dem über ein SDS-Gel aufgetrennte Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Sartorius; 0,2 μm) übertragen und anschließend über Immunodetektion nachgewiesen werden können.

Semi-Dry-Blot:

Semi-Dry-Puffer, pH 9,2 (1 l):

Tris	5,8 g
Glycin	2,92 g
10% SDS	3,7 ml
Methanol	200 ml
A. dest.	ad 1 l

Nitrozellulosemembran und 6 Filterpapierstücke (Whatman, 3 mm) wurden entsprechend der Gelgröße zurechtgeschnitten und zusammen mit dem Gel in Semi-Dry-Blotpuffer getränkt. Der Blot wurde dann luftblasenfrei wie folgt zusammengelegt:

Kathodenseite

3 x Filterpapier

Gel

Nitrozellulosemembran

3 x Filterpapier

Anodenseite

Auf die Blotvorrichtung wurde ein Gewicht von ca. 750 g gestellt. Der Transfer erfolgte eine Stunde bei 117 mA. Um festzustellen, ob der Transfer vollständig war, wurde die Membran mit Ponceau gefärbt. Anschließend wurde die Membran auf gewünschte Weise

zurechtgeschnitten, zum Entfärben mit Wasser gewaschen und bis zur Immunodetektion im Dunkeln gelagert.

Immunodetektion:

Puffer:

PBS: 16 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl

PBS-T: 0,1% Tween 20 in PBS

Blotto: PBS-T mit 2% (w/v) Milchpulver

ECL 1 (frisch), 2,5 ml: 1 M Tris-HCl pH 8,5 250 µl

30% H₂O₂ 1,6 µl

H₂O 2,25 ml

ECL 2, 100 ml: 1 M Tris-HCl pH 8,5 10 ml

250 mM Luminol-Lösung 1 ml

90 mM p- 440 µl

Coumarinsäurelösung

Antikörper:

Nach Bedarf in Blotto verdünnt.

Protein	Molekulargewicht	Reinigung	Herkunft	Verdünnung	Referenz
SNAP29	29	Serum	Kaninchen	1 : 1000	R. Jahn
Syntaxin 6	31		Maus	1 : 5000	Transduction
Syntaxin 7	30	Serum	Kaninchen	1 : 1000	R. Jahn
Syntaxin 8	27	Serum	Kaninchen	1 : 1000	G. Fischer von Mollard
Syntaxin 13	30	Affinitäts- gereinigt	Kaninchen	1 : 1000	R. Jahn
Syntaxin 16	37	Serum	Kaninchen	1 : 1000	G. Fischer von Mollard

Protein	Molekulargewicht	Reinigung	Herkunft	Verdünnung	Referenz
VAMP4	18	Serum	Kaninchen	1 : 1000	G. Fischer von Mollard
Vti1a	27	Affinitäts- gereinigt	Kaninchen	1 : 3000	G. Fischer von Mollard
Vti1b	29	Affinitäts- gereinigt	Kaninchen	1 : 3000	G. Fischer von Mollard

2. Antikörper (je nach Bedarf): α -Maus-IgG-Antiserum, HRP-gekoppelt aus Ziege (1:20000 in PBS-T)

α -Kaninchen-IgG-Antiserum, HRP-gekoppelt aus Ziege (1:20000 in PBS-T)

Alle Schritte fanden bei RT auf einer Wippe statt.

Um unspezifische Bindungsstellen zu reduzieren, wurde die Nitrozellulosemembran 30 min mit Blotto geschüttelt. Anschließend wurde die Membran 1-2 Stunden mit dem in Blotto verdünnten 1. Antikörper inkubiert. Nachdem die Membran 3 x mindestens 5 min mit PBS-T gewaschen wurde, wurde sie 1-2 Stunden mit dem 2. Antikörper inkubiert. Es folgte 5 x mindestens 5 minütiges Waschen mit PBS-T. Vor der ECL-Behandlung wurde die Membran 1 x mit PBS gespült. Frisch angesetztes ECL 1 und ECL 2 wurden kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran für 1 min darin geschwenkt. Bei Antikörpern, die mit dem ECL-System schwer nachweisbar waren, wurde ein Kit von Pierce nach Anleitung benutzt. Durch 1-30 minütige Exposition eines auf die Membran gelegten Röntgenfilms wurden die Banden sichtbar gemacht.

2.5.7 Coomassiefärbung

Mit der Coomassie-Färbung können in Acrylamidgelen aufgetrennte Proteine mit einer Nachweisgrenze von 0,1µg detektiert werden. Die Gele wurden dazu in Coomassie-Lösung eine Stunde geschwenkt. Entfärbt wurde einige Stunden oder über Nacht.

Coomassie-Lösung:	0,4% (w/v)	Serva Blau R-250
	50% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Essigsäure
	40% (v/v)	ddH ₂ O
Entfärbelösung:	10% (v/v)	Essigsäure
	40% (v/v)	Methanol
	48% (v/v)	ddH ₂ O

2.5.8 Richtungsorientierte Kopplung von Antikörpern an Protein A bzw. Protein G Sepharose

Lösungen:

KPi-Puffer	100 mM	KPi pH 7,4
NatriumBoratpuffer	0,1 M	NaBorat pH 7,5
TRIS	1 M	Tris-HCl pH 7,5
PBS-Azid	10 mM	Natriumazid in PBS

300 µl Protein A bzw. 100 µl Protein G Sepharose wurden viermal mit je 1 ml KPi gewaschen. Je 100µl der Protein A Sepharose wurden mit 50 µl Serum (α-Vt1a bzw. α-Syntaxin 16) und 200 µl KPi versetzt und 100 µl Protein G Sepharose mit ...µl α-Syntaxin 6, die übrigen 100 µl nur mit 250 µl KPi. Die Bindung der Antikörper an Protein A bzw. Protein G Sepharose fand eine Stunde bei RT auf einem Drehrad statt. Nach zweimaligem Waschen mit 0,1 M Natriumborat, wurde die Sepharose mit je 400 µl Natriumborat, dem Dimethylpimelidatin mit einer Endkonzentration von 4,5 mg/ml frisch

hinzugefügt wurde, 30 min auf einem Drehrad inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 1 M Tris-HCl pH 7,5, wurden die Beads in 1 M Tris-HCl pH 7,5 zwei Stunden bei RT auf einem Drehrad gedreht. Zum Schluß wurde die Sepharose noch einmal mit PBS gewaschen und dann in PBS mit 10 mM Natriumazid bei 4°C gelagert.

Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Tischzentrifuge 10 sec bei RT und 4000 UpM durchgeführt.

2.5.9 Isolation von SNARE-Komplexen aus tierischen Geweben

Lösungen:

Puffer 1:	320 mM	Saccharose
Puffer 2:	50 mM	TRIS/HCl pH 7,4
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
Puffer 3:	1%	Triton X-100 in Puffer 2
(Solubilisierungspuffer)		
Elutionspuffer	0,1 M	Glycin/HCl pH 2,5
(Protein A Sepharose)		
PBS-Azid:	10 mM	Natriumazid in PBS

2.5.9.1 Gewinnung von Synaptosomen aus Hirngewebe

Ein Rattenhirn wurde in 15 ml Puffer 1 (1:1000 PMSF wurde frisch dazugegeben) in einem Glas-Teflon-Potter mit 8 Hüben bei 1000 UpM homogenisiert. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurde das Gewebehomogenat im JA-20 Rotor bei 4°C 2 min mit 2000 UpM zentrifugiert. Das Pellet 1 mit den Zelltrümmern wurde verworfen, der Überstand 1 wurde im JA-20 Rotor bei 4°C 12 min mit 11000 UpM abzentrifugiert. Der Überstand 2 wurde verworfen, das Pellet 2, die Synaptosomenfraktion, wurde in ca. 5 ml Puffer 2 resuspendiert, in Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert. Vor der Weiterverarbeitung wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

2.5.9.2 Isolation von SNARE-Komplexen aus Synaptosomen (Hirn) mittels Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation wurde mit polyklonalem Antikörpern (α -Vt1a, α -Syntaxin 16), die an Protein A Sepharose gekoppelt wurden und mit monoklonalem an Protein G Sepharose gekoppelten α -Syntaxin 6, durchgeführt. Dazu wurden 2,5 mg Synaptosomen aus dem Hirn in 2,5 ml Puffer 3 mit 1:1000 PMSF bei 4°C auf einem Drehrad langsam bewegt. Die Proteinkonzentration betrug 1 mg/ml. Zur Abtrennung ungelöster Membranbestandteile wurden die solubilisierten Membranen im TL 100.3 Rotor 20 min bei 4°C und 50000 UpM zentrifugiert. Vom Überstand (Ü) wurde 1 ml auf 100 μ l der verschiedenen antikörpergekoppelten Beads, sowie 1 ml auf 100 μ l Protein A Sepharose gegeben, um zu kontrollieren, was an Protein A allein haften bleibt. Nachdem die Ansätze 2 Stunden bei 4°C auf einem Drehrad gedreht wurden um eine Bindung von komplexgebundenem Vt1a, Syntaxin 16 und Syntaxin 6 (und die jeweiligen Proteine allein) zu ermöglichen, wurde die Sepharose durch 10 sekundige Zentrifugation bei 4000 UpM sedimentiert und der Überstand mit den ungebundenen Proteinen (un) abgenommen. Die Sepharose wurde dann 3 x 5 min mit Puffer 3 gewaschen.

Zwischen den Waschsritten wurden die Beads durch 10 sekundige Zentrifugation mit 4000 UpM sedimentiert. Um die gebundenen Proteine zu eluieren wurden 100 μ l 0,1 M Glycin-HCl pH 2,5 auf die Beads gegeben und alles 10 min bei 4°C langsam auf einem Drehrad bewegt. Nachdem die Beads wieder durch Zentrifugation (10 sec, 4000 UpM) sedimentiert wurden, konnte das Eluat (E) vorsichtig abpipettiert werden. Um das Eluat zu neutralisieren, wurden 2 μ l 1 M Tris-HCl pH 9,0 hinzugefügt. Um die Beads erneut verwenden zu können, wurden sie 2 x mit PBS gewaschen und in PBS-Azid bei 4°C gelagert. Die Proben Ü, un und E wurden 2:1 mit 3 x Probenpuffer gemischt und davon je 25 μ l zur Westernblotanalyse auf ein SDS-Gel aufgetragen. Für den Blot zum Nachweis von Vt1a wurde das Eluat 1:1 mit 2 x Probenpuffer gemischt. Die auf das Gel aufgetragene Menge betrug 10 μ l.

2.5.10 Herstellung von Zellhomogenat zur Westernblotanalyse

0,5% Triton X 100 in PBS

Konfluent bewachsenen 6 cm Zellkulturschalen wurden mit PBS gewaschen, in 500 μ l 0,5% Triton X-100 mit frisch zugesetztem PMSF (1:1000) abgeschabt und durch sechsmaliges Auf- und Abziehen mit einer 22g Kanüle homogenisiert. Auf die Proteinbestimmung nach Bradford, folgte die Analyse der Proben mittels SDS-Gel und Westernblot, wobei gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

2.5.11 Gewinnung von Gewebehomogenat und Messung der Aktivität von lysosomalen Enzymen in Geweben

Frisch präparierte Organe wurden sofort auf Eis gestellt und gewogen. Für 100 mg Gewebe wurden 900 μ l 1 x TBS hinzugefügt und die Gewebe anschließend mit einem Ultra-Turrax Homogenisator homogenisiert. Ein Teil des Homogenats wurde für Westernblotanalysen sofort bei -20°C eingefroren. Vom Rest wurden 1:10 und 1:100 Verdünnungen hergestellt, die mit Triton X-100 (0,05% (w/v)) versetzt und bis zur Bestimmung der Aktivitäten lysosomaler Enzyme ebenfalls bei -20°C gelagert wurden.

Die Aktivitäten folgender lysosomaler Enzyme wurden anhand angegebener Substrate bestimmt:

β -Hexosaminidase (β -Hex) mit 4-Methyl-Umbelliferyl-2Acetamidodeoxy- β -D-Glucopyranosid

β -Galactosidase (β -Gal) mit 4-Methyl-Umbelliferyl- β -D-galactopyranosid

β -Glucuronidase (β -Glc) mit 4-Methyl-Umbelliferyl- β -D-Glucopyranosid

β -Mannosidase (β -Man) mit 4-Methyl-Umbelliferyl- β -D-Mannopyranosid

Substratpuffer: 0,1M Natriumcitrat pH 4,6

0,08% (w/v) NaAzid

0,4% (w/v) BSA

Stopplösung: 0,2M Glycin/NaOH pH 10,8

Für jede zu untersuchende Probe wurden drei Reaktionen angesetzt. Eine diente als Kontrolle und beinhaltete das benötigte Volumen von Homogenat und Substratpuffer (gesamt 60 μ l) ohne Substrat. Für die zwei anderen Reaktionen wurde die benötigte Menge Homogenat auf 10 μ l mit Substratpuffer aufgefüllt und anschließend 50 μ l Substrat zugefügt. Die Proben wurden dann bei 37°C für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Hinzufügen von 2 ml Stopplösung beendet. Gemessen wurde die Enzymaktivität in einem Fluoreszenz-Spektrophotometer (Exzitation: 365 nm; Emission: 410 nm). Die gemessenen Werte wurden mit den Leerwerten verrechnet und in mU/g umgerechnet.

Probenvolumina und Inkubationszeiten für die Messung der Aktivitäten lysosomaler Enzyme:

	Leber	Niere	Hirn	Milz
β -Hex	0,05 30	0,05 30	0,05 30	0,05 30
β -Gal	0,1 120	0,1 120	0,1 180	0,1 120
β -Glc	0,1 120	0,1 120	1 120	0,1 120
β -Man	0,1 60	0,1 60	1 60	1 120

Die obere Zahl bezieht sich auf das Probenvolumen der unverdünnten Homogenate (in μ l), die untere Zahl gibt die Inkubationszeit an (in min).

2.5.12 Endozytose von FITC-Dextran

Maus-embryonale Fibroblasten verschiedenen Genotyps wurden auf Coverslips ausplattiert und bei 60-70%iger Konfluenz für Experimente benutzt. FITC-Dextran (MW=14000)-Lösung (100mg/ml) wurde aufgetaut und bei 4°C und 13000 Upm für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde für das Experiment eingesetzt. Pro ml DMEM (mit 10%FKS) wurden 20 µl des Überstandes hinzugegeben. Jedes Coverslip wurde mit 200µl dieser Mischung bedeckt und für verschiedene Zeiten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3% PFA in PBS 30 min bei Raumtemperatur fixiert, zwei mal mit PBS gewaschen und in DAKO® Medium eingebettet, um das schnelle Ausbleichen durch Oxidation zu verhindern. Nach Polymerisation des DAKO® Medium wurden die Präparate bei 4°C unter Lichtausschluß gelagert. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Lasermikroskop.

2.5.13 Endozytose von fluoreszent-markiertem LDL

Maus-embryonale Fibroblasten verschiedenen Genotyps wurden auf Coverslips ausplattiert und bei 60-70%iger Konfluenz für Experimente benutzt. Die Zellen wurden zwei mal mit PBS gewaschen um tote Zellen und FKS zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen 2 Stunden in serumfreiem DMEM (1% BSA) ausgehungert. Das Hungermedium wurde mit serumfreiem DMEM (1% BSA, 10µg/ml fluoreszent-markiertes low-density Lipoprotein (LDL, BODIPY®, Molekular Probes, USA) ersetzt und die Zellen erneut 30 min bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Zellen mit serumfreiem DMEM (1% BSA) für verschiedene chase-Zeiten wiederum bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3% PFA in PBS 30 min bei Raumtemperatur fixiert, zwei mal mit PBS gewaschen und in DAKO® Medium eingebettet, um das schnelle Ausbleichen durch Oxidation zu verhindern. Nach Polymerisation des DAKO® Medium wurden die Präparate bei 4°C unter Lichtausschluß gelagert. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Lasermikroskop.

2.5.14 Endozytose von Avidin

Maus-embryonale Fibroblasten verschiedenen Genotyps wurden auf Coverslips ausplattiert und bei 60-70%iger Konfluenz für Experimente benutzt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen für 20 min mit Avidin-haltigem DMEM (3,2 mg/ml Endkonzentration) bei 37°C inkubiert. Auf das Waschen mit eiskaltem PBS folgte eine zweite Inkubationsphase mit verschiedenen Zeiten (chase) mit markerfreiem Medium. Anschließend wurden die Zellen mit 3% PFA in PBS 30 min bei Raumtemperatur fixiert, zwei mal mit PBS gewaschen und mit Anti-Avidin und Anti-LAMP1 kofärbt (siehe 3.5.2.).

2.5.15 In vitro-Endosomenfusionsassay

2.5.15.1 Internalisierung von fluid phase-Markern in frühe und späte Endosomen

Frühe Endosomen

Konfluente MEF wurden 1x mit eiskaltem PBS gewaschen und für 1 min mit eiskaltem Trypsin inkubiert, um sie von den Zellkulturschalen zu lösen. Die Zellen wurden mit eiskaltem DMEM-Medium geerntet und jeweils 1x mit eiskaltem PBS und eiskaltem OPTI-MEM, 10 mM D(+)-Glucose (Internalisierungsmedium) gewaschen und 5 min mit 1000 Upm bei 4°C pelletiert. Anschließend wurden die Zellen im vierfachen Volumen (vol/vol) Internalisierungsmedium resuspendiert und 5 min bei 37°C vorinkubiert. Dann wurden äquimolare Mengen an Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase (bHRP) für das Akzeptor-bzw. Donorkompartiment zugesetzt (3,2 mg/ml Endkonzentration für Avidin und 1,7 mg/ml für bHRP). Nach weiteren 5 min Inkubation bei 37°C wurde die endozytische Aufnahme der Marker in die Zellen durch Transfer auf Eis und anschließender Zentrifugation für 5 min mit 1000 Upm bei 4°C gestoppt. Durch 4x Waschen mit eiskaltem PBS/BSA (5 mg/ml) wurden Reste von nicht internalisierten, unspezifisch an den Zellen haftenden Markern entfernt und die Zellen durch 1x Waschen mit eiskaltem SI-Puffer (250 mM Saccharose, 3 mM Imidazol-HCl, pH 7,4 für die anschließende Homogenisierung umgepuffert.

Späte Endosomen

Die Markierung von späten Endosomen erfolgte durch die Inkubation der wie bei den frühen Endosomen erhaltenen Zellsuspension mit markerhaltigem Internalisierungsmedium für 20 min bei 37°C (pulse). Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS/BSA wurden die Zellen in markerfreiem DMEM (2 mg/ml BSA) für 60 min bei 37°C inkubiert, um den aufgenommenen Markern genug Zeit zu geben, späte endosomale Kompartimente zu erreichen. Anschließend wurden die Zellen noch 2x mit PBS/BSA gewaschen, bevor sie in SI-Puffer für die Homogenisierung umgepuffert wurden.

2.5.15.2 Präparation der subzellulären Fraktionen

Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Die abzentrifugierten Zellen wurden in vierfachem Volumen (vol/vol) Homogenisierungspuffer (SI-Puffer mit zugesetzten Proteaseinhibitoren 0,2 mM PMSF, 0,7 µg/ml Pepstatin A, 1µg/ml Leupeptin) und mit einem Kugelhomogenisator aus Stahl (Innendurchmesser 0,2501 Zoll) aufgebrochen.

Als optimale Bedingungen für 1:4 in SI-Puffer verdünnte MEF (Wildtyp) wurden 10 Passagen mit einer Metallkugel von 0,2489 Zoll Durchmesser und eine anschließende Zentrifugation von 5 min mit 2500 Upm ermittelt.

Die resultierenden postnukleären Überstände (PNS) wurden in 200 µl Aliquots bei -20°C gelagert.

Der Markergehalt der Organellen wurde durch Zentrifugation von PNS für 30 min bei 55000 Upm (95000 x g) im TLA 120.2 Rotor bei 4°C und anschließender Messung der bHRP-Aktivität im Membranpellet bestimmt (Latency-Messung).

Eine Trennung von frühen und späten Endosomen wurde mit isopyknischer Dichtegradientenzentrifugation erzielt. Die PNS wurden vorsichtig auf 40,6% Saccharose eingestellt und mit einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten überschichtet (GRUENBERG et al., 1991). Nach 90 minütiger Zentrifugation bei 35000 Upm im Beckman SW41 Rotor wurden die späten Endosomen auf Höhe der Homogenisierungspuffer/ 25% Saccharose-Interphase und die frühen Endosomen auf Höhe der 25%/ 35% Saccharose-Interphase abgenommen.

2.5.15.3 Zellfreier Fusionsassay

Für die Fusionsexperimente wurde PNS in 4 mg/ml und Cytosol in 1,25 mg/ml Endkonzentration eingesetzt. 200 µl Reaktionsansätze mit 11,25 mM HEPES, pH 7,0, 1,35 mM Magnesiumacetat, 0,18 mM DTT, 45 mM Kaliumacetat und 0,05 mg/ml biotinyliertes Insulin als Quencher (alles Endkonzentrationen), Cytosol, Avidin- und bHRP-PNS (wie oben beschrieben) wurden auf Eis zusammen pipettiert. Durch Zugabe eines ATP-regenerierenden oder –depletierenden Systems (1,6 mM ATP, 13 mM Kreatinphosphat und 0,066 mg Kreatinphosphokinase bzw. 15 U Hexokinase in 250 mM D(+)-Glucose) und Transfer auf 37°C wurden die Fusionsreaktionen gestartet und nach 45 min auf Eis gestoppt. Nach Extraktion mit 1% Triton in Gegenwart von Quencher und anschließender Immunopräzipitation des bei der Fusion gebildeten Avidin-bHRP-Komplexes mit Anti-Avidin-gekoppelter ProteinA Sepharose wurde die Fusion durch Messung der gebundenen Peroxidase-Aktivität bestimmt. Die Enzymaktivität der bHRP wurde photometrisch bei 414 nm quantifiziert. Als Substrate dienten ABTS und H₂O₂ (AL-KAISSI und MOSTRATOS, 1983).

Um den Effekt von N-Ethylmaleimid (NEM) zu testen, wurden die beiden PNS und das Zytosol getrennt mit 1 mM NEM für 15 min auf Eis vorinkubiert, dann erfolgte Zugabe von 2 mM DTT und eine weitere 10minütige Inkubation auf Eis.

Für die Inhibierungsexperimente mit Antikörpern gegen verschiedene SNARE-Proteine erfolgte eine getrennte Vorinkubation der PNS zusammen mit den Antikörpern im Fusionsassaypuffer für 10 min auf Eis.

3 Ergebnisse

3.1 Inhibition der Proteolyse von Syntaxin 8 in Vti1b-ko-Mäusen

Die Proteinmenge von Syntaxin 8, dem Qc-SNARE des von W. Antonin (ANTONIN et al., 2000b) charakterisierten endosomalen SNARE-Komplexes, ist in Vti1b-heterozygoten Mäusen wenig, in Vti1b-defizienten Mäusen stark reduziert. Die Proteinmengen der weiteren Komplexpartner Endobrevin und Syntaxin 7 sind nicht beeinträchtigt (ATLASHKIN et al., 2003). Diese Reduktion ist entweder auf Unterschiede in der Synthese oder der Stabilität des Proteins zurückzuführen, da weder die Transkription noch die mRNA-Stabilität beeinträchtigt war. Um diese Frage zu klären, wurden durch Passagieren immortalisierte Maus-embryonale Fibroblasten (MEF) von Wildtyp- und Vti1b-defizienten Embryonen benutzt. Gleiche Mengen MEF von Kontrollzellen und Vti1b-defizienten Zellen wurden mit und ohne Proteaseinhibitoren inkubiert und mittels Immunoblotting der Effekt der Inhibitoren auf die Proteinmenge von Syntaxin 8 überprüft. Da die Degradierung von Proteinen sowohl in Proteasomen als auch in Lysosomen stattfinden kann, wurde Lactacystein als Inhibitor der proteasomalen und Leupeptin als Inhibitor der lysosomalen Degradierung gewählt. Im Gegensatz zu Vti1b-defizienten Zellen, die nicht mit Proteaseinhibitoren behandelt wurden, konnte nur bei Leupeptin-behandelten Zellen eine geringe Stabilisierung von Syntaxin 8 nach 17 Stunden Inkubation beobachtet werden. Lactacystein hatte keinen Effekt auf die Proteinmenge von Syntaxin 8 (Abb.7).

Dass die Stabilisierung von Syntaxin 8 erst nach längerer Inkubationszeit zu beobachten ist, zeigt ein Versuch, in dem Vti1b-defiziente Zellen für 8, sowie für 16 Stunden mit Leupeptin behandelt wurden. Erst bei den 16 Stunden-Werten kann eine deutliche Erhöhung der Proteinmengen von Syntaxin 8 beobachtet werden und damit eine Stabilisierung des Syntaxin 8 (Abb.8).

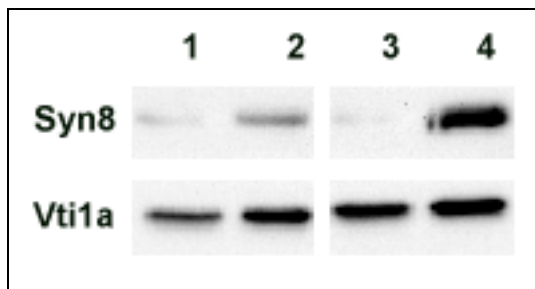


Abb.7: Stabilisierung der Syntaxin 8 Proteinmenge in Vti1b-defizienten Zellen mittels Leupeptin

Kontrollzellen (Spur 4) und Vti1b-defiziente MEF (Spur 1, 2 und 3) wurden für 17 Stunden mit 50 μ M Lactacystein (Spur 1), 100 μ M Leupeptin (Spur 2) und ohne Proteaseinhibitor (Spur 3 und 4) bei 37°C inkubiert und anschließend Zellhomogenate gewonnen, die zur Westernblotanalyse benutzt wurden. Anti-Vti1a diente zur Überprüfung der aufgetragenen Proteinmengen. Im Vergleich zu unbehandelten Vti1b-defizienten Zellen und Zellen, die mit Lactacystein behandelt wurden, konnte eine geringe Stabilisierung von Syntaxin 8 Proteinmengen in den Zellen beobachtet werden, die mit Leupeptin behandelt wurden.

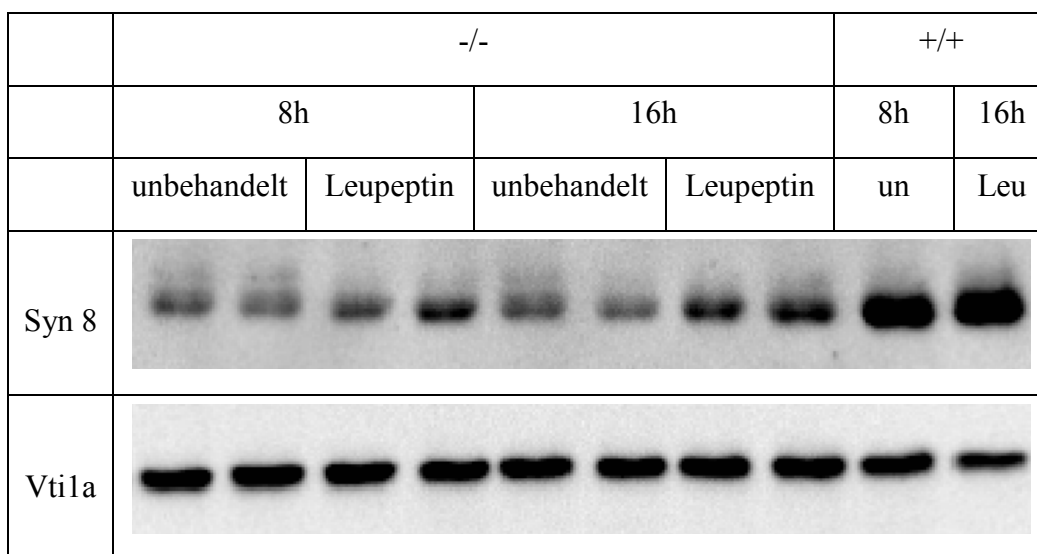


Abb.8: Stabilisierung von Syntaxin 8 in Vti1b-defizienten Zellen mittels Leupeptin in Abhängigkeit von der Zeit

Vti1b-defiziente MEF wurden für 8 bzw. 16 Stunden mit oder ohne Leupeptin bei 37°C inkubiert und nach Gewinnung von Zellhomogenaten mittels Immunoblotting analysiert. Als Kontrolle dienten zusätzlich Wildtyp-MEF. Ein deutlicher Unterschied in den Proteinmengen von Syntaxin 8 ist erst bei den 16 h-Werten zu beobachten.

Un: unbehandelt

Leu: Leupeptin

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass nicht eine reduzierte Syntheserate von Syntaxin 8, sondern die Proteolyse des Proteins in Lysosomen der Grund für die reduzierte Proteinmenge von Syntaxin 8 in Vti1b-defizienten Zellen ist.

3.2 Endosomenfusionsassay

Die Methode des endosomalen Fusionsassays wurde ausgewählt, um unterschiedliche MEF-Zelllinien besser charakterisieren zu können. In PC12 Zellen konnte nachgewiesen werden, dass Antikörper gegen Vti1a die Fusion von frühen Endosomen, nicht jedoch die Fusion von späten Endosomen hemmen konnten. Vti1b, Endobrevin, Syntaxin 7 und Syntaxin 8, die Komponenten des von W. Antonin identifizierten SNARE-Komplexes, hemmen die Fusion von späten Endosomen, nicht jedoch die von frühen Endosomen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Vti1b-beinhaltende Komplex für die Fusion der späten Endosomen verantwortlich ist (ANTONIN et al., 2000b).

Für die vorliegende Dissertation sollte ein Endosomenfusionsassay für MEF etabliert werden, um ein Werkzeug für die Analyse von endosomalen SNAREs zur Verfügung zu haben. Die zur Analyse zur Verfügung stehenden Zelllinien, die durch Passagieren von embryonalen Mausfibroblasten gewonnen wurden, haben die in Tabelle 1 angegebenen Genotypen.

	Vti1b	Endobrevin
E1	+/+	+/+
E5	-/-	+/+
N6	-/-	-/-
N4	+/-	+/+
C7	-/-	-/-

Tab.1: Genotypen der zur Analyse mittels Endosomenfusionsassay zur Verfügung stehenden MEF

In der linken Spalte sind die Namen für die jeweilige Zelllinie angegeben, die im Endosomenfusionsassay benutzt wurden. Gleiche Anfangsbuchstaben bedeuten, dass die Zellen von Embryonen desselben Muttertieres erhalten wurden.

3.2.1 Generelle Funktionsweise des Endosomenfusionsassays

In getrennte MEF-Zellpopulationen wurden zwei komplementäre Marker (Avidin und bHRP), die zusammen mit Flüssigkeit unspezifisch endozytiert werden (fluid phase Marker), entweder nur für 5 min bzw. 20 min gefolgt von einer 60minütigen Inkubation in markerfreiem Medium zur Markierung von frühen bzw. späten Endosomen internalisiert. Nach Homogenisierung der Zellen und Präparation der endosomenhaltigen postnukleären Überstände (PNS) wurde die Fusionsreaktion durch Inkubation der gemischten PNS in Gegenwart von Cytosol und ATP bei 37°C initiiert.

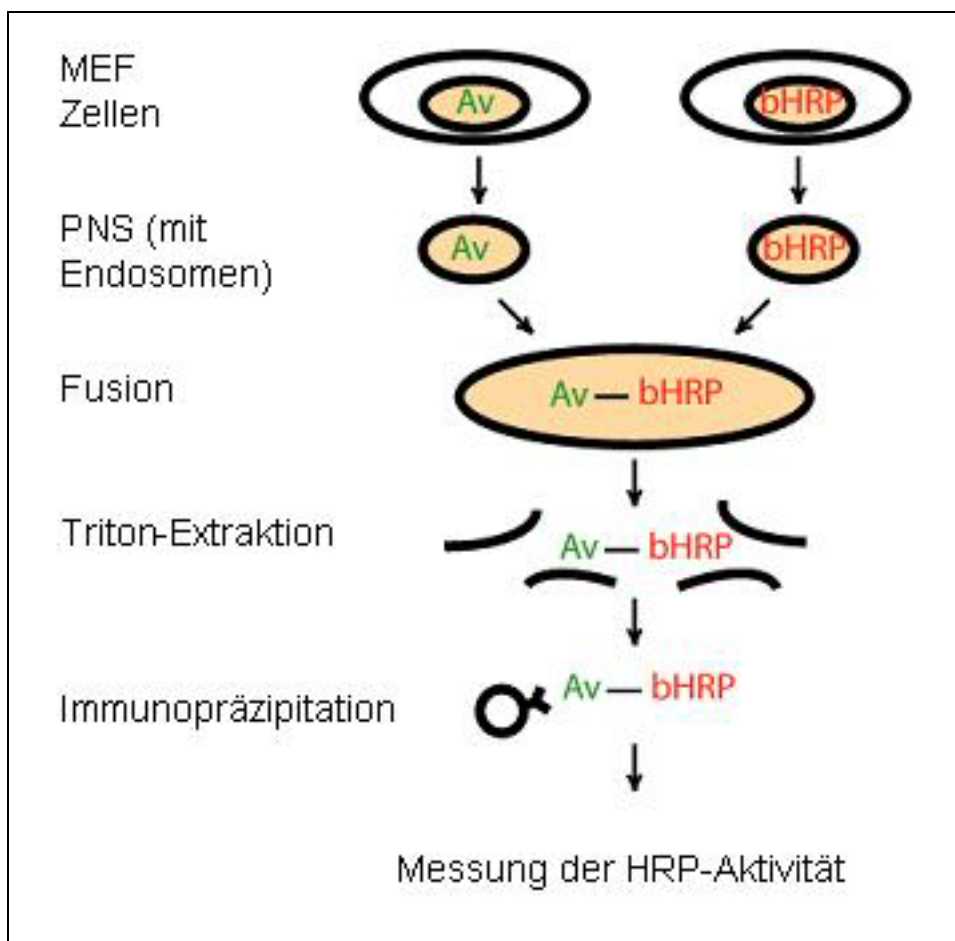


Abb.9: Generelles Schema des Endosomenfusionsassays

Av: Avidin

bHRP: biotinylierte Horseradish Peroxidase

MEF: Maus-embryonale Fibroblasten

PNS: postnukleärer Überstand

Die beiden endozytierten Marker bilden bei Fusion einen stabilen Komplex, der immunopräzipitiert werden kann. Als Maß für die Fusion dient die Quantifizierung der HRP-Aktivität. Zur Verhinderung der Bildung von unspezifischen Avidin-bHRP-Komplexen nach der Lyse der Endosomen, wurde der Fusionsreaktion biotinyliertes Insulin als Quencher zugefügt. In Abb.9 ist ein generelles Schema des Fusionsassays dargestellt.

Da die Präparation eines fusionsfähigen PNS unter anderem auch von dem verwendeten Zelltyp abhängig ist, wird im Folgenden genauer auf die Homogenisierungsbedingungen für MEF eingegangen.

3.2.2 Etablierung eines Endosomenfusionsassays für frühe und späte Endosomen aus MEF

Zunächst wurde ein zellfreier Fusionsassay für MEF-Endosomen etabliert, wobei auf bereits vorhandene Methoden zurückgegriffen wurde (GORVEL et al., 1991; GRUENBERG et al., 1991; LINK et al., 1993; ANTONIN et al., 2000b), die leicht modifiziert wurden. Für den Fusionsassay mussten durch möglichst genau definierte Homogenisierungsbedingungen PNS aus den MEF generiert werden, die noch intakte markierte Endosomen enthielten. Die Effizienz der Markeraufnahme in die Organellen wurde über die Menge an HRP-Aktivität bestimmt, die sich nach Zentrifugation des PNS in der Membranfraktion befand. Das Verhältnis dieser Aktivität zum korrespondierenden membranfreien Überstand ließ auf die Menge intakter markierter Organellen schließen. Ausreichend intakte Organellen für effiziente Fusionsaktivitäten sollten im PNS vorhanden sein, wenn mindestens 50% der HRP-Aktivität im Membranpellet des PNS ist. Bei einer geringeren HRP-Aktivität ist davon auszugehen, dass die Zellen zu stark homogenisiert wurden. Allerdings tragen auch Zelltrümmer im PNS zur HRP-Aktivität bei, welche die Fusionsaktivität negativ beeinflussen.

Durch mehrere Testläufe mit Wildtyp-Zellen wurden folgende, für MEF optimale Homogenisierungsbedingungen ermittelt:

Zellaufschluss mittels: Metallhomogenisator

Durchmesser der Kugel: 0,2489 Zoll

Verdünnung der Zellen: 1:4

Anzahl der Passagen: 10

Zentrifugation: 5 min bei 2500 UpM

Diese Bedingungen ergaben bei Präparationen von EE aus Kontrollzellen eine durchschnittliche HRP-Aktivität von ca. 65 bis 70 % in der Membranfraktion.

3.2.3 Effizienz der Markeraufnahme in MEF in Abhängigkeit vom Genotyp und der markierten Organellen (frühe Endosomen, späte Endosomen)

Es stellte sich heraus, dass die bei Abschnitt 3.2.2 ermittelten optimalen Homogenisierungsbedingungen für frühe Endosomen von Wildtypzellen (E1) auch für späte Endosomen-Präparationen, sowie für Präparationen von frühen und späten Endosomen von Zelllinien mit differierendem Genotyp anwendbar waren. Nur bei der Präparation von späten Endosomen von Zelllinien, die für *Vti1b* und Endobrevin doppeldefizient sind (N6, C7) wurden HRP-Aktivitäten von höchstens 51% im Membranpellet erhalten.

Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, dass die HRP-Aktivität im Membranpellet nicht von der, für jede Präparation unterschiedlichen Gesamtaktivität im PNS sowie vom Verhältnis der Gesamtaktivität zu Gesamtprotein abhängt. Bei einem vergleichbaren Verhältnis von Gesamtprotein zu Gesamtaktivität im PNS (z.B. die Präparation von späten Endosomen der Zelllinie N4 verglichen mit der ersten Präparation von späten Endosomen der Zelllinie N6) werden sehr unterschiedliche HRP-Aktivitäten im Membranpellet erhalten (N4 64%, N6 35%).

Genotyp	Präparation	Aktivität von HRP im PNS (OD)	Protein im PNS (mg/ml)	<i>HRP</i>	HRP-Aktivität im Membran-pellet (%)
				<i>Protein(mg)</i>	
Wildtyp (E1)	EE	5,6	7,5	0,75	75
		3,3	10,3	0,32	63
		4,1	6,4	0,64	71
Wildtyp (E1)	LE	2,6	7,4	0,35	56
Vti1b -/- (E5)	EE	2,5	11,3	0,22	67
Vti1b -/- (E5)	LE	4,5	8,2	0,55	63
Vti1b +/-; Endobrevin +/+ (N4)	EE	7,5	7,3	1,03	67
Vti1b +/-; Endobrevin +/+ (N4)	LE	1,5	5,9	0,25	64
Vti1b -/-; Endobrevin -/- (N6)	EE	2,2	7,9	0,28	74
Vti1b -/-; Endobrevin -/- (N6)	LE	1,5	6,4	0,23	35
		1,8	8,1	0,22	46
		2,4	8,1	0,30	35
Vti1b -/-; Endobrevin -/- (C7)	LE	2,4	3,0	0,8	51

Tab.2: HRP-Aktivität im Membranpellet von Präparationen früher und später Endosomen aus unterschiedlichen Zelllinien

Angegeben wurde jeweils der beste erzielte Wert. Bei den Präparationen von frühen Endosomen der Zelllinie E1 und von späten Endosomen der Zelllinie N6 wurden zur Verdeutlichung der Variabilität innerhalb einer Zelllinie drei Werte angegeben.

EE: frühe Endosomen (Aufnahme des Markers für 5 min)

LE: späte Endosomen (Aufnahme des Markers für 20 min plus 60 min Chase)

Das lässt vermuten, dass es einen Zusammenhang zwischen präparierter Organelle sowie Genotyp der Zelllinie gibt. Nach diesen Messungen lässt sich behaupten, dass Präparationen von späten Endosomen eher geringere Aktivitäten von HRP im

Membranpellet haben als Präparationen von frühen Endosomen. Am deutlichsten wird dies bei Zellen, die doppeldefizient für Vti1b und Endobrevin sind (N6, C7), deren höchste gemessene HRP-Aktivität bei 46 % (N6) bzw. 51% (C7) liegt.

Da eine geringe HRP-Aktivität im Membranpellet auf zu starke Homogenisierung zurückzuführen ist, wurden für die Zelllinie N6 Optimierungsversuche unternommen, bei denen die Anzahl der Passagen durch den Zellhomogenisator, sowie die Größe der Metallkugel variiert wurde. Das in Tabelle 2 angegebene Ergebnis von 46% war der optimalste erhaltene Wert und wurde mit der oben erwähnten Metallkugel und 8 Passagen der Zellsuspension durch den Zellcracker erzielt. Um weiterhin auszuschließen, dass die geringe HRP-Aktivität der Präparationen später Endosomen der N6 Zelllinie an den Homogenisierungsbedingungen liegt, wurde die Zelllinie C7 mit den für alle anderen Zelllinien normalerweise optimalen Bedingungen getestet. Das geringfügig bessere Ergebnis von 51 % deutet darauf hin, dass die niedrigen Werte der HRP-Aktivität im Membranpellet von Vti1b- und Endobrevin-doppeldefizienten Zelllinien funktioneller Natur sind. So könnte zum Beispiel eine vom Wildtyp unterschiedliche Morphologie von späten Endosomen der Grund für die stärkere Lyse während der Homogenisierung sein.

Ein Zusammenhang zwischen der Gesamtaktivität vom HRP im PNS pro mg Protein und den verschiedenen Zelllinien lässt sich nicht feststellen. In Tabelle 2 verdeutlichen die Werte der Zelllinie E1, dass es große Variationen dieses Messwertes innerhalb einer Zelllinie gibt. Unterschiedlich guter Zustand der Zellen zum Zeitpunkt der Markeraufnahme kann hierfür als Grund angegeben werden.

3.2.4 Endosomenfusionsassays mit Wildtypzellen sowie Vti1b-defizienten Zellen

Diejenigen PNS-Präparationen, die eine hohe Effizienz in der Markeraufnahme aufwiesen, wurden für Endosomenfusionsassays eingesetzt. Als erstes wurde mit Präparationen von frühen Endosomen aus Wildtypzellen getestet, ob eine Fusion überhaupt stattfindet und ob sie sich mit dem Sulfhydrylgruppen-alkylierenden Reagenz N-Ethylmaleimid (NEM) inhibieren lässt. Wie auch in anderen Zelltypen beschrieben (HOLROYD, 2001) ist die Fusionsreaktion ATP-abhängig. Inkubation mit einem ATP-verbrauchenden System resultierte in vollständiger Fusionsinhibierung. Ebenfalls in

vollständiger Inhibierung resultierte die Vorbehandlung von PNS und Cytosol mit NEM (Abb.10).

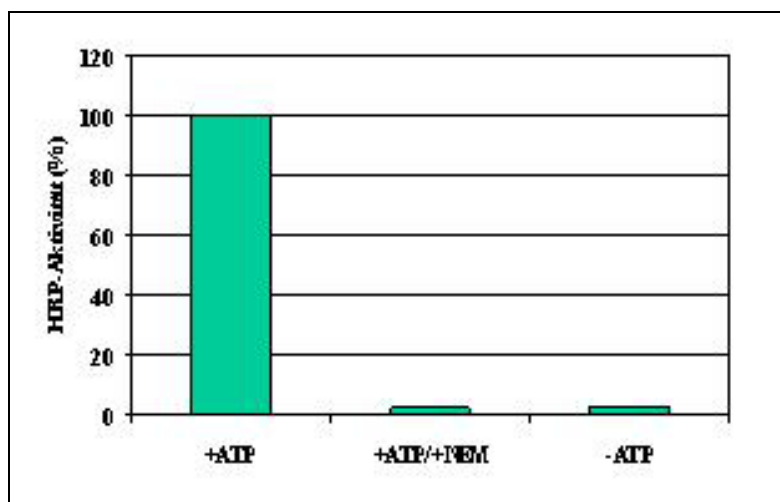


Abb.10: Abhängigkeit der Fusionsreaktion von ATP und NEM

Frühe Endosomen-Präparationen von Wildtypzellen wurden benutzt, um einige Charakteristika der Fusionsreaktion in MEF zu testen. Die Fusionsansätze wurden in An- oder Abwesenheit von ATP (Balken 1 bzw.3), bzw. mit NEM vorbehandelt in Anwesenheit von ATP inkubiert (Balken 2). Die immunpräzipitierte HRP-Aktivität im Fusionsansatz mit ATP wurde als 100% Wert benutzt.

Die ATP-Abhängigkeit und die Inhibierung der Fusion durch NEM lässt den Schluss zu, dass es sich bei der gemessenen HRP-Aktivität tatsächlich um ein Maß für SNARE-vermittelte Endosomenfusion handelt.

Nun konnten weitere Versuche vorgenommen werden. Abb. 11 zeigt vier Fusionsreaktionen mit frühen und späten Endosomen jeweils aus Wildtyp- und Vti1b-defizienten Zellen, die gleichzeitig angesetzt und gemessen wurden. In der Grafik wurde die absolute HRP-Aktivität im Immunpräzipitat angegeben. Auch frühe Endosomen und späte Endosomen aus Vti1b-defizienten Zellen fusionierten untereinander. Die Vergleichbarkeit der Werte basiert auf den eingesetzten Proteinmengen von Avidin- und bHRP-markierten PNS, die immer 400 µg betrug. Betrachtet man die erhaltenen Werte aus dieser Sicht, könnte man behaupten, dass Wildtypzellen eine etwas höhere Fusionseffizienz haben als Vti1b-defiziente Zellen. Ebenfalls auffällig ist die vergleichsweise hohe Fusionseffizienz der späten Endosomen. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob bei den präparierten späten Endosomen eventuell noch frühe Endosomen

zur Fusionseffizienz beitragen, also ob die übernommenen Markierungszeiten für späte Endosomen die richtigen Zeiten für MEF sind. Versuche zur Klärung dieser Frage sind in Kapitel 3.6.4 zu finden.

Ein zusätzlicher Faktor ist die HRP-Aktivität genormt auf das pelletierbare HRP pro Assay, das sich bei jeder Präparation unterscheidet. Dieser Unterschied liegt unter anderem am jeweiligen Allgemeinzustand der Zellen. Je nachdem ob die Zellen in guter oder schlechter Kondition zum Zeitpunkt der Markierung sind, nehmen sie unterschiedliche Mengen von Marker auf und dementsprechend ist beim Vergleich von unterschiedlichen Zelllinien und Präparationen zu bedenken, dass eine höhere absolute HRP-Aktivität nicht unbedingt eine bessere Fusionsaktivität bedeutet. Genausogut könnte es auch sein, dass die Organellen einfach mehr detektierbaren Marker aufgenommen haben. Die PNS-Präparation ist auch wichtig. Hierbei entscheidet sich, wie groß der Prozentsatz fusionsfähiger Organellen im PNS ist. So wird deutlich, dass aufgrund von Variablen, welche am besten mit den Begriffen Zellkondition sowie präparatives Geschick zu beschreiben sind, es nicht möglich ist, Fusionseffizienzen von verschiedenen Präparationen miteinander zu vergleichen.

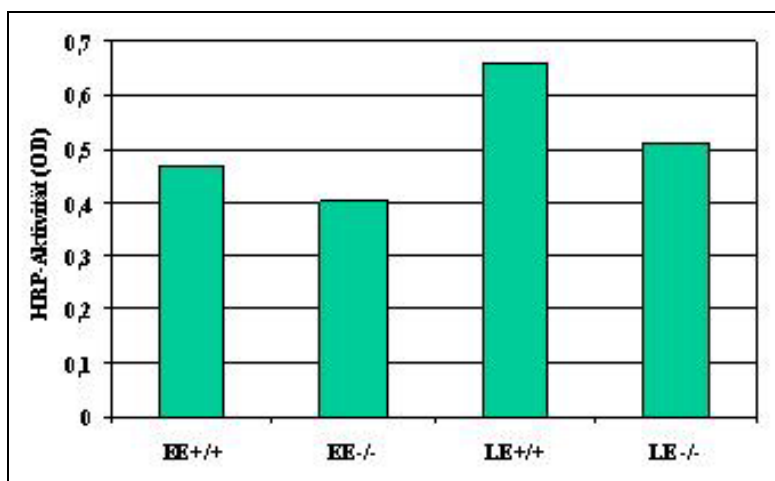


Abb.11: Fusionseffizienz von frühen und späten Endosomen von Wildtyp-MEF und *Vti1b*-defizienten Zellen

In der Grafik wird die pro Fusionsassay eingesetzte Proteinmenge zum Vergleich herangezogen.

EE: frühe Endosomen

LE: späte Endosomen

Weitere Versuche haben gezeigt, dass selbst zwei Präparationen der gleichen Zelllinie und des gleichen Organells in der absoluten Fusionseffizienz nicht vergleichbar sind (Abb.12).

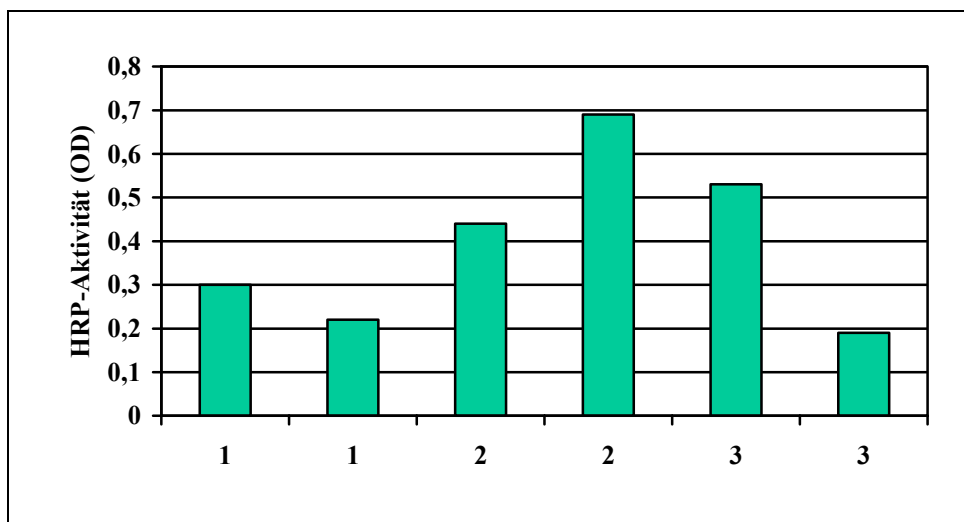


Abb.12: Sechs Endosomenfusionsassays mit drei verschiedenen Präparationen von frühen Endosomen aus Wildtyp-MEF

Bei gleichen Nummern handelt es sich um dieselbe Präparation. Die Assays wurden alle an verschiedenen Tagen angesetzt und ausgewertet. Die Varianz der Fusionseffizienz wird schon beim Vergleich identischer Präparationen deutlich.

Mit dem nachfolgend beschriebenen Experiment sollte untersucht werden, ob die Präparationen von späten Endosomen frei von frühen Endosomen sind. Da späte Endosomen nicht mit frühen Endosomen direkt fusionieren, sollte bei einer Kombination von Avidin-markierten frühen Endosomen mit bHRP-markierten späten Endosomen bzw. bHRP markierten frühen Endosomen und Avidin-markierten späten Endosomen kaum Fusion nachweisbar sein. In Abb.13 kann man sehen, dass die Fusionseffizienz des gemischten Ansatzes von bHRP-markierten frühen Endosomen mit Avidin-markierten späten Endosomen (29%) höher als die Effizienz von später endosomaler Fusion (7,5%) ist. Das könnte bedeuten, dass die Präparationen von späten Endosomen mit frühen Endosomen verunreinigt sind, weswegen erneut die Frage aufgeworfen wird, ob die korrekten Markierungszeiten gewählt wurden.

Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die späten Endosomen allein sowie der kombinierte Reaktionsansatz mit HRP-markierten späten Endosomen und Avidin-markierten frühen Endosomen nur 7,5 % Fusionseffizienz zeigen. Das deutet darauf hin, dass die HRP-markierten späten Endosomen fast inaktiv waren. Das Experiment wurde zwei mal wiederholt, jedoch war bei den Wiederholungen auch bei der Kontrolle nur mit frühen Endosomen eine Fusion nicht mehr nachweisbar. Der Grund für den Zusammenbruch des sensiblen Assays konnte bis zu diesem Zeitpunkt nicht herausgefunden werden.

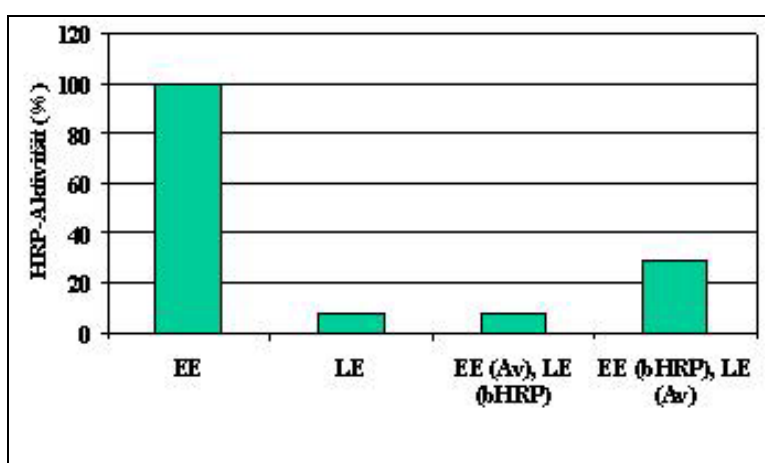


Abb.13: Fusionsansätze zwischen verschiedenen Endosomen von Wildtypzellen

Je eine Präparation von frühen sowie späten Endosomen von Wildtyp-Zellen wurde entweder für normale Fusionsreaktionen oder für gemischte Fusionsreaktionen eingesetzt.

EE: frühe Endosomen

LE: späte Endosomen

Av: Avidin

3.2.5 Inhibierung der Fusion von frühen Endosomen mit affinitätsgereinigten Antikörpern

Um die Frage zu klären, ob in *Vti1b*-defizienten Zellen die Fusion von späten Endosomen beeinträchtigt ist und ob eventuell andere SNAREs, wie zum Beispiel *Vti1a* eine redundante Funktion im Membrantransport übernehmen, sollte der Effekt von affinitätsgereinigten Antikörpern auf die Fusionsreaktion untersucht werden. Es wurde

eine Wildtyp-Präparation von frühen Endosomen mit Antikörpern gegen Vti1a, Vti1b, Syntaxin 7 und Syntaxin 8 getestet. Im Gegensatz zu den von W. Antonin erzielten Ergebnissen zeigte Anti-Vti1a eine kaum nennenswerte Hemmung, Anti-Syntaxin 7 jedoch hemmte die Fusion von frühen Endosomen um ca. 88% (Abb.14). Da es sich hierbei um unspezifische Inhibierung aufgrund einer starken Besetzung der endosomalen Membranen mit den großen IgG-Molekülen gegen Syntaxin 7 handeln könnte, sollten von den vier eingesetzten Antikörpern Fab-Fragmente hergestellt und in dem Fusionsassay eingesetzt werden. Für die Generierung von Fab-Fragmenten werden große Mengen affinitätsgereinigten Antikörpers gebraucht, weshalb zunächst alle benötigten Antikörper einer Affinitätsreinigung unterzogen wurden. Leider funktionierte aus unbekanntem Gründen die Affinitätsreinigung von Anti-Syntaxin 7 nicht. Dieser Antikörper wäre aber für alle nachfolgenden Versuche, welche die Fusion von späten Endosomen in Vti1b-defizienten Zellen untersuchen, eine unverzichtbare Kontrolle, da in Vti1b-defizienten Zellen zusätzlich die Proteinmenge von Syntaxin 8 stark reduziert ist und von Anti-Endobrevin nicht genügend Antikörper zur Herstellung von Fab-Fragmenten zur Verfügung stand. Aus diesen Gründen wurde auf weitere Experimente in dieser Richtung verzichtet.

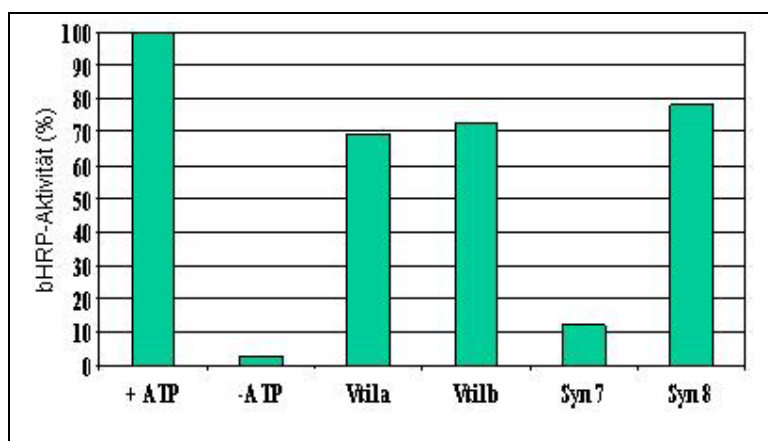


Abb.14: Effekt von affinitätsgereinigten Antikörpern auf die Fusion von frühen Endosomen von Wildtypzellen

Die ersten beiden Balken stellen die Fusionsaktivität in Anwesenheit (+ATP) und Abwesenheit (-ATP) dar. Die restlichen Balken zeigen den hemmenden Effekt der affinitätsgereinigten Antikörper Vti1a, Vti1b, Syntaxin 7 und Syntaxin 8.

3.2.6 Probleme mit dem Endosomenfusionsassay

Die oben beschriebenen Fusionsassays machen deutlich, dass sich der Endosomenfusionsassay nicht für den direkten Vergleich von unterschiedlichen PNS-Präparationen und damit auch nicht für den direkten Vergleich von Zelllinien mit verschiedenem Genotyp eignet.

Die Klärung der Frage, ob die Markierungszeiten für späte Endosomen die Richtigen sind wurde von zwei Seiten angegangen. Zum einen wurde versucht, mittels isopyknischer Dichtegradientenzentrifugation von Präparationen später Endosomen, eine Trennung des PNS in frühe und späte Endosomen zu erreichen und somit auf das Vorhandensein von frühen Endosomen in den Präparationen Rückschlüsse ziehen zu können (Daten nicht gezeigt). Diese Trennungen waren aber nicht ausreichend genug, um zuverlässige Aussagen über die Markerverteilung in den Organellen zu treffen. Deshalb wurden die zur Verfügung stehenden Zelllinien für unterschiedliche Zeiten mit Avidin markiert und anschließend mit Anti-Avidin und LAMP1 doppelgefärbt, um so den Zeitpunkt zu ermitteln, zu dem Avidin späte endosomale Kompartimente erreicht (3.6.4).

3.3 RNAi von SNAP29 in Wildtyp-MEF und *Vti1b*-defizienten Zellen

Die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) beruht auf der Tatsache, dass small interfering RNAs (siRNAs) die Genexpression in eukaryotischen Zellen unterdrücken können. Gelangt doppelsträngige RNA (dsRNA) in eine Zelle, wird sie von Dicer, einem RNaseIII-ähnlichem Enzym, in kleine ca. 20 bis 25 Nukleotide große Stücke gespalten. Mit diesen bilden sich anschließend Endoribonuklease-enthaltende Komplexe, sogenannte RISCs (RNA-induced silencing complexes), welche zu den siRNAs komplementäre RNA binden, schneiden und somit zerstören. In Säugerzellen führt eine mehr als 30 Nukleotide lange dsRNA zu einer wirkungsvollen antiviralen Antwort, welche unspezifische Inhibierung der Proteinsynthese und Degradierung von RNA nach sich zieht (ELBASHIR et al., 2001; McMANUS und SHARP, 2002). Diese antivirale Antwort von Säugerzellen kann mit siRNA umgangen werden, welche im vorliegenden Fall in einen siRNA-Expressionsvektor kloniert und in MEF stabil transfiziert wurde.

Zur Klärung der Frage, ob eventuell SNAP29 die Funktion von Vti1b und Syntaxin 8 in Vti1b-defizienten Zellen übernimmt, sollten sowohl in Wildtyp-Zellen als auch in Vti1b-defizienten Zellen je eins von zwei Plasmiden des Kits GeneSilencer transfiziert werden, in die jeweils eine zu SNAP29 homologe Sequenz (namentlich a und b) inkloniert wurde. Da sowohl der benutzte Vektor pSHH als auch die Vti1b-defizienten Zellen Neomycinresistenz besitzen, wurde ein Vektor kotransfiziert, der eine Selektion mit Hygromycin erlaubte. Falls durch den Hygromycin-Selektionsvektor eine Beeinflussung der RNAi stattfinden sollte, wurde er zusätzlich alleine in Wildtypzellen und Vti1b-defiziente MEF transfiziert.

Für jedes Konstrukt wurden von den Wildtyp-Zellen 24 Klone gepickt. Von den Klonen mit Konstrukt a überlebten 14 Klone, bei Konstrukt b gab es 16 Überlebende. Bei den defizienten Zellen überlebten nach der Transfektion nur je ein Klon, welche aber abstarben, bevor sie analysiert werden konnten. Von den gepickten 4 Wildtyp-Klonen, die nur den Hygromycin-Selektionsvektor enthielten, überlebten alle, bei den nur mit Hygromycin-Selektionsvektor transfizierten Vti1b-defizienten MEF konnte ein Klon gepickt werden, der aber nicht überlebte.

Die 30 Klone der Wildtyp-Zellen wurden mittels quantifizierenden Immunoblottings auf eine Unterdrückung der Genexpression von SNAP29 getestet. Nur bei einem Klon (Nr.a8) konnte mittels Quantifizierung eine Reduzierung der Expression von SNAP 29 auf 56% festgestellt werden (Abb.15). Die Analyse durch Immunoblotting fand zweimal statt, um die Reduzierung der Expression von SNAP29 zu verifizieren. Auf eine weitere Analyse wurde wegen der fehlenden Vti1b-defizienten Zellen mit RNAi verzichtet.

Das Absterben der Vti1b-defizienten Zellen kann daran liegen, dass die von den Konstrukten hervorgerufene RNAi für die Zellen letal war, da sie, falls SNAP29 komplementär zu Vti1b und Syntaxin 8 ist, eventuell SNAP29 in hohen Mengen brauchen. Da jedoch in den Kontrollzellen nur in einem Klon ein Effekt beobachtet werden konnte und außerdem keine Vti1b-defizienten Klone gewonnen werden konnten, die nur mit dem Hygromycin-Vektor transfiziert wurden, ist es wahrscheinlicher, dass die Vti1b-defizienten Zellen die Transfektionsbedingungen nicht überlebten und falls andere Transfektionsbedingungen kein besseres Resultat bringen, sie als nicht transfizierbar eingestuft werden sollten.









	1	2	3	4
SNAP29				
Vti1a				
	100%	195%	73%	56%

Abb.15: SNAP29-RNAi in Wildtyp MEF

Von den gepickten Zellklonen wurden Zellhomogenate gefertigt und je 20 µg Protein davon mittels SDS-Gel aufgetrennt. Die Blots wurden mit Antiseren gegen SNAP29 und Vti1a gefärbt und anschließend quantifiziert. In Spur eins ist die Kontrolle, nur mit Hygromycinresistenzvector transfizierte Kontrollzellen (E1), aufgetragen, Spur zwei ist der Klon b1/4, Spur 3 der Klon b1/10 und Spur 4 der Klon a4/8. Die Prozentzahlen sind das Ergebnis der Quantifizierung der SNAP29-Menge. Sie geben das Verhältnis von SNAP29 zu Vti1a an, das für die Kontrolle auf 100% gesetzt wurde. Es wurde für die Kontrollzellen (Spur 1) auf 100% gesetzt.

3.4 Identifizierung von Syntaxin 16 als fehlende Komponente des endosomalen SNARE-Komplexes mit Vti1a

Mittels Immunopräzipitationen mit immobilisiertem polyklonalem Antikörper gegen Vti1a aus solubilierten Hirn- und Nierenmembranen konnten das Qc-SNARE Syntaxin 6 und das R-SNARE VAMP4 koimmunopräzipitiert und einem gemeinsamen SNARE-Komplex zugeordnet werden (KREYKENBOHM, 2001).

Von einem aus vier SNARE-Motiven bestehendem Komplex wurde somit das R-SNARE, das Qb- und das Qc-SNARE identifiziert. Ein aufgrund von Sequenzanalysen und subzellulärer Verteilung sehr wahrscheinlicher Kandidat für das Vierte am Komplex beteiligte Qa-SNARE ist Syntaxin 16. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein polyklonales Antiserum gegen Syntaxin 16 hergestellt.

3.4.1 Polyklonales Antiserum gegen Syntaxin 16

Die Sequenz von Syntaxin 16 basiert auf der Sequenz von humanem Syntaxin 16, einer Ratten EST und zwei Maus ESTs (Genbank AF008936, AW524540, AI426461 und AI956297). Für die PCR-Amplifikation aus einer Rattenhirn-cDNA-Bibliothek wurden die folgenden Primerpaare benutzt: GGGGTCTCAAAGGGTGAGAC und CTAGCGAGACTTTACGGCGACGAG sowie für die Re-Amplifikation des erhaltenen PCR-Produkts die Primer CGGGATCCATGGCCACCAGGCGTTAAC und GGAATTCACCTCCGRTTCTTCTTYTGRATG. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pGEM-Teasy und für die PCR-Amplifikation der codierenden Sequenz der N-terminalen Domäne (Aminosäure 1-239) eingesetzt. Die hierfür benutzten Primer hatten die Sequenz GCATATGGCCACCAGGCGTTAAC und GGAATTCACCTCTCGCTCCCTCTCCTC.

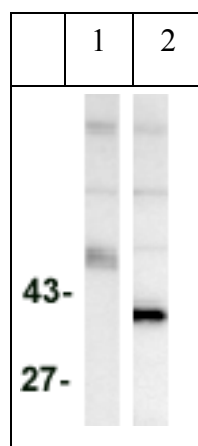


Abb. 16: Test des polyklonalen Antiserums ODTN gegen Syntaxin 16

Immunoblots von Hirnhomogenat, die mit 6His-Syntaxin 16 (pBK103) vorinkubiertem Anti-Syntaxin 16-Serum (Spur 1) sowie Anti-Syntaxin 16-Serum (Spur 2) getestet wurden. Zu erkennen ist eine spezifische Bande bei ca. 41 KD (Spur 2), die in Spur eins fehlt.

Die erhaltene cDNA wurde in den Vektor pET-28a eingefügt und dieser in *E. coli* transformiert. Das so erhaltene rekombinante 6His-Syntaxin 16 diente der Immunisierung eines Kaninchens (ODTH). Das gewonnene Serum wurde mittels Immunoblotting an Hirnhomogenat getestet. In Abb. 16 ist zu sehen, dass Anti-Syntaxin 16 eine spezifische

Bande von ca. 41 KD erkennt, was dicht am vorhergesagten molekularen Gewicht von 37 KD liegt.

3.4.2 Gewebsspezifische Verteilung von Syntaxin 16

Um die gewebsspezifische Verteilung von Syntaxin 16 zu untersuchen, wurde ein Immunoblot mit zehn verschiedenen Gewebshomogenaten aus Maus angefertigt und mit dem bei 3.4.1 beschriebenen Antiserum gefärbt. Reichlich Syntaxin 16 konnte in den Organen Nebenniere, Herz, Hirn und Niere nachgewiesen werden, geringe Mengen kamen in Leber, Thymus und Pankreas vor. In Lunge, Milz und Skelettmuskel konnte Syntaxin 16 nicht nachgewiesen werden (s. Abb.17).

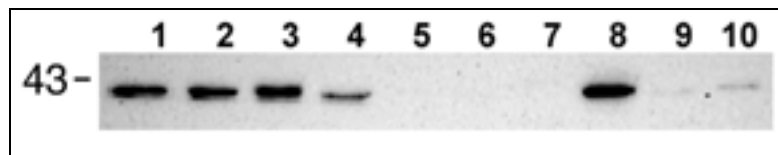


Abb. 17: Gewebsspezifische Verteilung von Syntaxin 16

Immunoblot mit verschiedenen Gewebshomogenaten: 1 Nebenniere, 2 Herz, 3 Hirn, 4 Leber, 5 Lunge, 6 Milz, 7 Skelettmuskel, 8 Niere, 9 Pankreas und 10Thymus
Aufgetragen wurden je 20 µg Protein.

Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass die bei der Immunopräzipitation von Vti1a und Syntaxin 6 verwendeten Gewebe Hirn und Niere, sich ebenfalls für eine Immunopräzipitation mit immobilisiertem Syntaxin 16 Antikörper eignen würden.

3.4.3 Vti1a, Syntaxin 6, VAMP4 und Syntaxin 16 bilden einen SNARE-Komplex

Immobilisierte Antiseren gegen Vti1a, Syntaxin 6 und Syntaxin 16 wurden für die Isolierung von SNARE-Komplexen aus Triton X-100 solubilisierten Synaptosomen aus Rattenhirn benutzt. Die angefertigten Immunoblots zeigen, dass zusammen mit Vti1a die SNAREs VAMP4, Syntaxin 16 und Syntaxin 6 isoliert werden konnten. Anti-Syntaxin 16

Antiserum koimmunopräzipitierte Vti1a und Syntaxin 6, mit immobilisiertem Syntaxin 6 konnte Vti1a im Eluat nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurde ein Blot mit Antiserum gegen das Q-SNARE Syntaxin 13 angefärbt, welches in keiner Eluatfraktion nachgewiesen werden konnte.

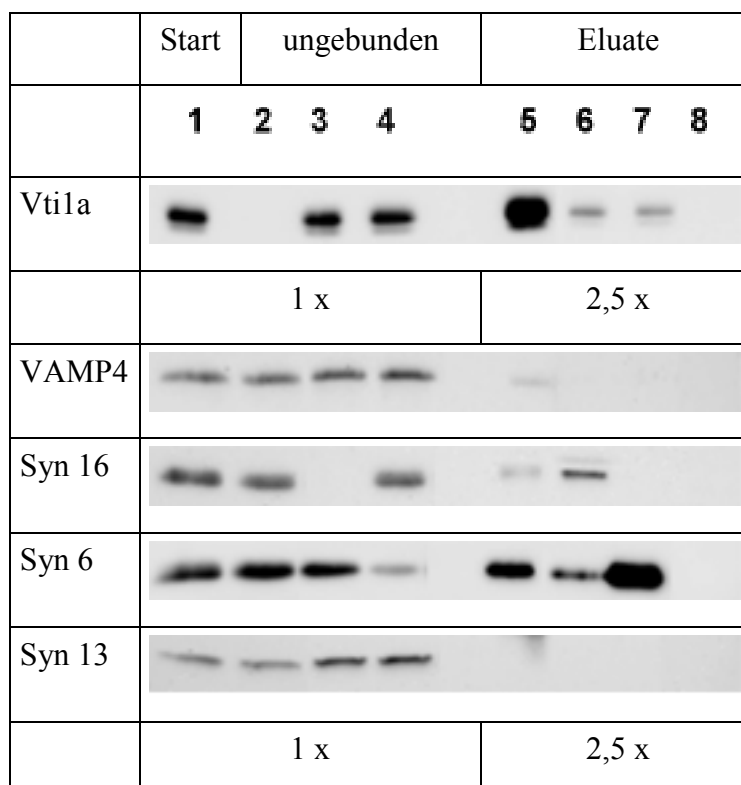


Abb. 18: Vti1a, VAMP4, Syntaxin 6 und Syntaxin 16 bilden einen SNARE-Komplex

Solubilisierte Synaptosomen aus Rattenhirn wurden mit an ProteinA Sepharose gekoppelten Antiseren gegen Vti1a oder Syntaxin 16 bzw. mit an ProteinG Sepharose gekoppelten monoklonalen Antikörpern gegen Syntaxin 6 inkubiert. Synaptosomen, ungebundene Fraktionen und Eluatfraktionen wurden mittels SDS-Gel und Immunoblotting untersucht.

Spur 1: Synaptosomen; Spur 2: ungebunden nach Anti-Vti1a-Beads; Spur 3: ungebunden nach Anti-Syntaxin 16- Beads; Spur 4: ungebunden nach Anti-Syntaxin 6-Beads; Spur 5: Eluat Anti-Vti1a-Beads; Spur 6: Eluat Anti-Syntaxin 16-Beads; Spur 7: Eluat Anti-Syntaxin 6-Beads; Spur 8: Eluat der Beads ohne gekoppelten Antikörper

Die Eluatfraktionen vom Vti1a-Immunoblot waren 2,5 x, die der anderen Blots 10 x konzentrierter, als das Ausgangsmaterial (Synaptosomen). Im Eluat der Vti1a-Beads konnten VAMP4, Syntaxin 16 und Syntaxin 6 nachgewiesen werden. Im Eluat der Syntaxin 16-Beads fanden sich Vti1a und Syntaxin 6. Syntaxin 6-Antikörper konnte Vti1a koimmunopräzipitieren.

Im Eluat von ProteinA Sepharose ohne gekoppelten Antikörper konnte ebenfalls kein SNARE nachgewiesen werden, weshalb die Ergebnisse als spezifisch zu bewerten sind (Abb. 18). Das VAMP4 Antiserum produzierte nur ein schwaches Signal im Eluat der effizienten Vti1a-Immunopräzipitation. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Menge an VAMP4 in den weniger effizienten Syntaxin 6- und Syntaxin 16-Immunopräzipitationen unter der Detektionsschwelle liegt. Auch ohne diese zusätzliche Kontrolle wird klar, dass Vti1a, VAMP4, Syntaxin 6 und Syntaxin 16 Partner eines SNARE-Komplexes sind.

3.5 Analyse von Vti1a-defizienten Mäusen

Um mehr über die Funktion von Vti1a im endosomalen Vesikeltransport herauszufinden, wurden Vti1a-Knockout-Mäuse generiert. Hierfür wurde das für die Aminosäuren 115-142 codierende Exon, welches für das SNARE-Motiv codiert, durch die Insertion eines Neomycin-Resistenzgens unterbrochen. Nach Elektroporation des Konstruktes in die embryonale Mäusestammzelllinie ES-14-1 wurde der positive Klon 132 in Blastocysten injiziert (ATLASHKIN, 2002). Auf diese Weise wurden chimäre Mäuse erhalten, die mit Mäusen der Linie C57BL/6J gekreuzt wurden. Heterozygote Mäuse wurden durch PCR ermittelt und miteinander gekreuzt. Vti1a-defiziente Mäuse wurden, den Mendelschen Regeln entsprechend, zu 25 % bei heterozygoten Verpaarungen erhalten. Die aus diesen heterozygoten Verpaarungen hervorgegangenen Vti1a-defizienten Mäuse waren zum größten Teil normalgewichtig, es gab aber auch wenige Mäuse, die kleiner waren als ihre Wurfgeschwister und die alle mit ca. einem Monat starben. Somit konnte nur mit den normalgewichtigen Vti1a-defizienten Mäusen weitergezüchtet werden. Aus diesen Verpaarungen wurden nur noch normalgewichtige Tiere erhalten, die alle lebensfähig und fertil sind.

3.5.1 Expression von SNARE-Proteinen in Vti1a-defizienten Zellen und Geweben

Als erstes wurden Hirn-, Leber-, Milz- und Nierenhomogenate von Wildtyp-Mäusen (+/+), heterozygoten (+/-) und Vti1a-defizienten (-/-) Tieren auf das Vorhandensein von Vti1a getestet. Abb.19 zeigt, dass Vti1a in defizienten Tieren nicht detektiert werden

kann. Der Knockout war also erfolgreich. Weiterhin fällt auf, dass Vti1a, genau wie auch Vti1b in Vti1b +/- Mäusen, in +/- Mäusen in geringerer Menge vorkommt, als in Wildtyp-Tieren.

Um zu erfahren, ob das Fehlen von Vti1a die Stabilität von anderen SNARE-Proteinen beeinträchtigt, wurden die Gewebehomogenate mit weiteren Immunoblots untersucht. Bei den getesteten SNAREs konnte kein Effekt der Vti1a-Defizienz festgestellt werden. Sowohl die Komplexpartner Syntaxin 16, Syntaxin 6 und VAMP4, als auch andere SNAREs waren nicht beeinträchtigt.

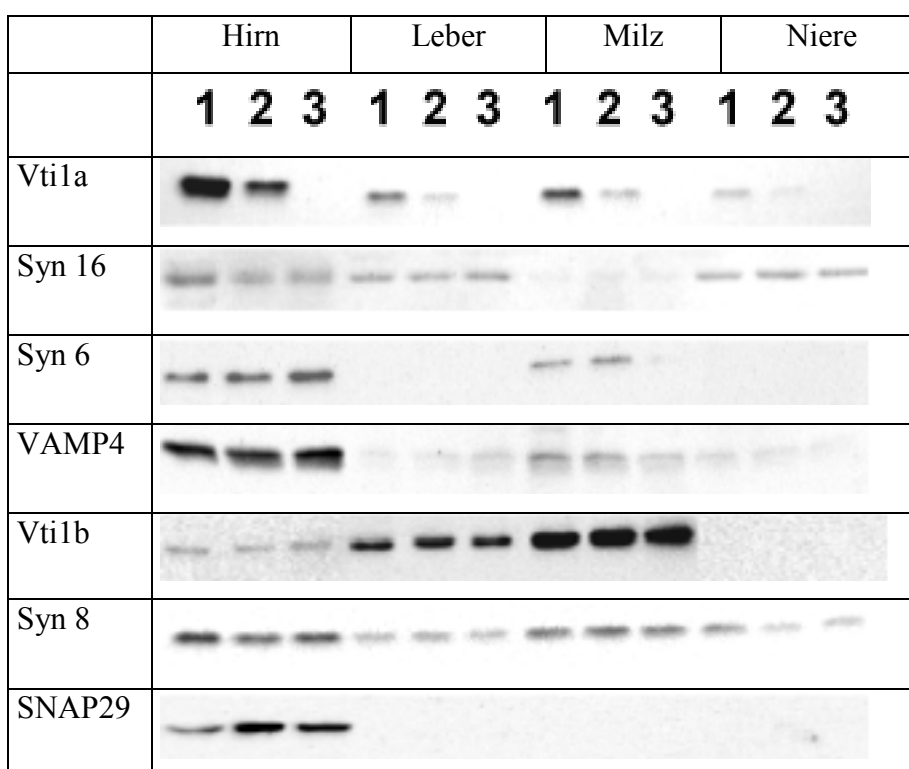


Abb. 19: Expression von SNARE-Proteinen in Wildtyp-Geweben, heterozygoten und Vti1a-defizienten Geweben

20µg Gewebsextrakt wurden mittels SDS-Gel getrennt und durch Immunoblotting mit den angegebenen Antisera und Antikörpern analysiert.

1: +/+ Gewebe

2: +/- Gewebe

3: -/- Gewebe

Da Syntaxin 6 in Abb.19 in Vt1a-defizienten Milzgeweben zu fehlen scheint, wurden gleiche Mengen Gewebehomogenat eines neuen Kontrolltieres und eines neuen Vt1a-defizienten Tieres mittels Immunoblottings untersucht. Es stellte sich heraus, dass Syntaxin 6 auch in Milz in Wildtyp-vergleichbaren Mengen vorhanden ist (Abb.20).

SNAP29, ein möglicher Kandidat der Vt1a bzw. Vt1b in Vt1a- oder Vt1b-defizienten Mäusen ersetzen könnte, war nicht beeinträchtigt. Da bei den zuerst getesteten Tieren die Menge von SNAP29 in heterozygoten und defizienten Tieren leicht erhöht zu sein scheint (Abb.19) wird auf Abbildung 20 verwiesen, wo vergleichbare Mengen von SNAP29 sowohl in Wildtyp-Tieren als auch in Vt1a-defizienten Tieren detektiert werden konnten. Auch in Homogenaten von Wildtyp-, heterozygoten und Vt1a-defizienten MEF konnte keine Erhöhung der SNAP29-Level festgestellt werden (Abb.21). Die Proteinmengen von Vt1b, dem wahrscheinlichsten Kandidat für die Kompensation der Vt1a-Defizienz, sind ebenfalls nicht beeinträchtigt (Abb.19). Allerdings kann das Ergebnis trotzdem eine Kompensation der Funktion von Vt1a in Vt1a-defizienten Mäusen durch SNAP29 bzw. Vt1b nicht ausschließen.

	Hirn		Leber		Milz		Niere	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Vt1a								
Syntaxin 6								
SNAP29								

Abb. 20: Expression von SNARE-Proteinen in Wildtyp-Geweben und Vt1a-defizienten Geweben

20µg Gewebsextrakt wurden mittels SDS-Gel getrennt und durch Immunoblotting mit den angegebenen Antisera und Antikörpern analysiert.

1: +/+ Gewebe

2: -/- Gewebe

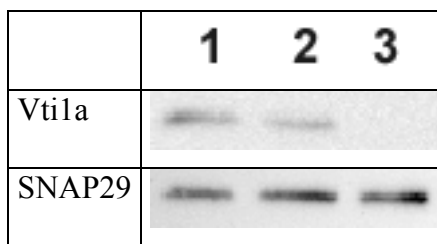


Abb. 21: Expression von SNARE-Proteinen in Wildtyp- und Vti1a-defizienten MEF

20µg Zellhomogenat wurden mittels SDS-Gel getrennt und durch Immunoblotting mit den angegebenen Antisera und Antikörpern analysiert.

1: +/+ (Zelllinie B6)

2: +/- (Zelllinie B1)

3: -/- (Zelllinie B4)

3.5.2 Aktivitäten von lysosomalen Enzymen in diversen Organen von Vti1a-defizienten Mäusen

Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR 46 bzw. MPR 300) vermitteln in Säugerzellen den Transport von lysosomalen Enzymen vom TGN ins prälysosomale Kompartiment (HILLE-REHFELD et al., 1995). Auch über den endozytotischen Weg können mit Hilfe von MPR300 lysosomale Enzyme ins Lysosom gelangen. Ausserdem werden beide MPRs durch retrograden Transport von frühen und späten Endosomen zum TGN recycelt (MEYER et al., 2000). Aufgrund dieser Beteiligung von MPRs an Transportschritten, die frühe Endosomen betreffen, wurden die Aktivitäten von lysosomalen Hydrolasen in Gewebehomogenaten aus Hirn, Leber, Milz und Niere von Wildtyp-Mäusen und Vti1a-defizienten Tieren untersucht.

Bei allen untersuchten lysosomalen Enzymen scheint die Aktivität in Niere, Milz und Leber in Vti1a-defizienten Tieren im Vergleich mit Wildtyp-Tieren leicht erhöht zu sein (Abbildungen 22a und 22b). Allerdings ist dieses Ergebnis aufgrund der hohen Standardabweichung nur als Tendenz und nicht als signifikant zu bewerten. In Hirnhomogenaten konnte kein Unterschied in der Aktivität lysosomaler Enzyme festgestellt werden (Abbildungen 22a und 22b). Die hohe Standardabweichung ist mit der niedrigen Anzahl der getesteten Tiere zu erklären. Sollte sich die Tendenz durch die

Untersuchung von mehr *Vt1a*-defizienten Tieren bestätigen, dann müsste man nach Gründen für die erhöhte Aktivität von lysosomalen Enzymen, bedingt durch *Vt1a*-Defizienz suchen.

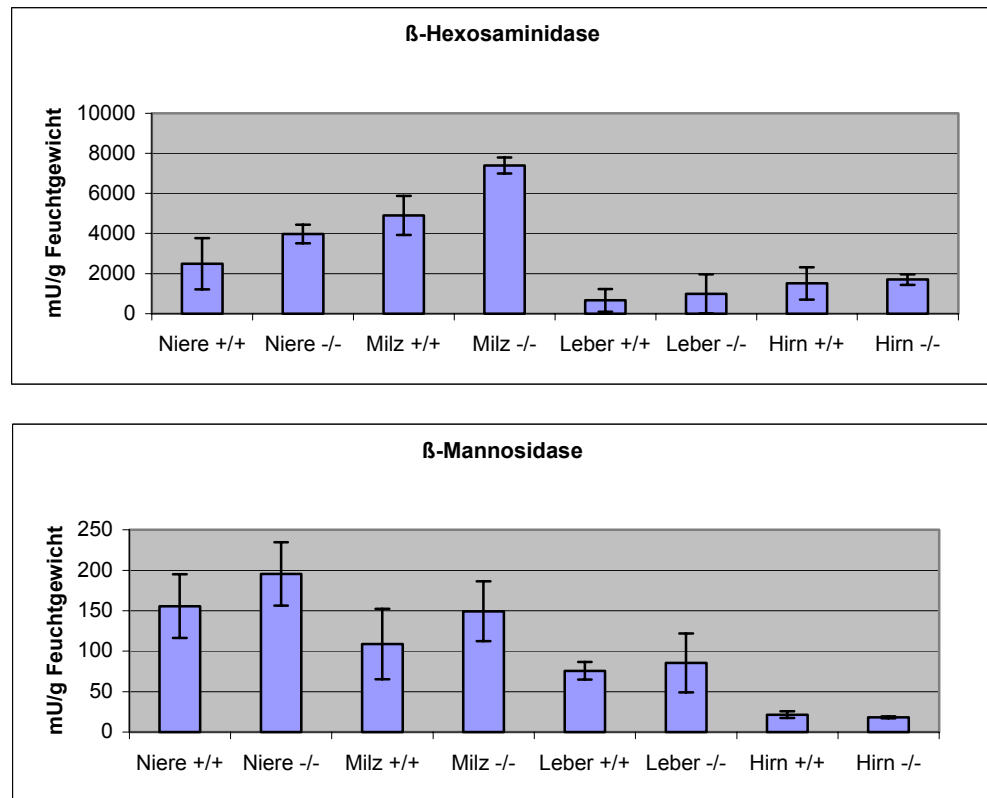


Abb. 22a: Aktivität lysosomaler Enzyme in Niere-, Milz-, Leber- und Hirn-Gewebehomogenaten von Wildtyp-Mäusen und *Vt1a*-defizienten Tieren

Die Balken geben Mittelwerte und Standardabweichungen der Enzymaktivitäten in Niere, Milz, Leber und Hirn von drei Kontrolltieren (+/+) und vier *Vt1a*-defizienten Mäusen (-/-) an. Die Enzymaktivität wurde in mU/g Feuchtwicht angegeben.

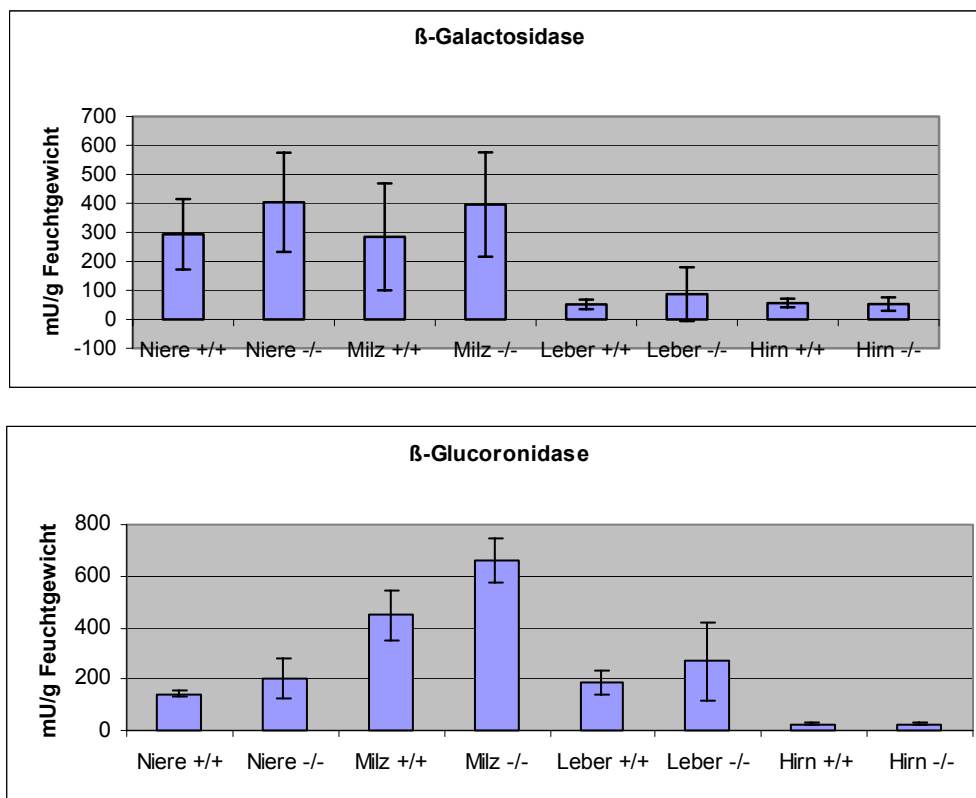


Abb. 22b: Aktivität lysosomaler Enzyme in Niere-, Milz-, Leber- und Hirn-Gewebehomogenaten von Wildtyp-Mäusen und *Vt1a*-defizienten Tieren

Die Balken geben Mittelwerte und Standardabweichungen der Enzymaktivitäten in Niere, Milz, Leber und Hirn von drei Kontrolltieren (+/+) und vier *Vt1a*-defizienten Mäusen (-/-) an. Die Enzymaktivität wurde in mU/g Feuchtgewicht angegeben.

3.6 Analyse von MEF unterschiedlichen Genotyps mit Methoden der Immunfluoreszenz und der Internalisierung von Markern

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente standen, außer der im Kapitel des Endosomenfusionsassays erwähnten Zelllinien, *Vt1a*-defiziente, sowie *Vt1a/Vt1b*-doppeldefiziente MEF zur Verfügung. Die Zelllinien E1 und E5 standen schon zu Beginn dieser Dissertation zur Verfügung. Alle anderen Zelllinien wurden im Laufe der Dissertation von 13,5 Tage alten Embryonen gewonnen und im Falle der Zelllinien AB5 und AB7 schon ab Passage 4 zu Experimenten verwendet. Alle anderen Zelllinien wurden

erst nach ihrer Immortalisierung durch wiederholtes Passagieren im allgemeinen ca. ab Passage 15 für Versuche genutzt. Gleiche Anfangsbuchstaben bedeuten, dass die verwendeten Embryonen aus demselben Muttertier gewonnen wurden. Eine komplette Auflistung der für die folgenden Versuche verwendeten Zelllinien ist in Tabelle 3 zu finden.

	Vt1a	Vt1b	Endobrevin
AB5	-/-	-/-	+/+
AB7	+/+	-/-	+/+
B1	+/-	+/+	+/+
B4	-/-	+/+	+/+
B6	+/+	+/+	+/+
C6	+/+	+/+	-/-
C7	+/+	-/-	-/-
E1	+/+	+/+	+/+
E5	+/+	-/-	+/+
N6	+/+	-/-	-/-

Tab.3: Genotypen von MEF

3.6.1 Immunfluoreszenzen

Damit Aussagen darüber getroffen werden konnten, ob in den zur Verfügung stehenden Zelllinien eine vom Wildtyp abweichende Verteilung von SNARE-Proteinen, lysosomalen oder Rezeptor-Proteinen vorliegt, wurden verschiedene Immunfluoreszenzen angefertigt und analysiert.

In Vt1a-defizienten (B4), Vt1a/Vt1b-doppeldefizienten (AB5) und Vt1b-defizienten (AB7) Zellen wurde überprüft, ob Vt1a bzw. Vt1b tatsächlich fehlen. In Abbildung 23 ist zu sehen, dass in Vt1a-defizienten Zellen mittels Immunfluoreszenzen kein Vt1a detektiert werden kann. In der Kontrollzelllinie B6 zeigte es die typische perinukleäre Färbung. Ebenso fehlt Vt1a zusammen mit Vt1b in Vt1a/Vt1b-doppeldefizienten

Zellen. In der Kontrollzelllinie für die Vti1a/Vti1b-doppeldefizienten Zellen konnte, wie erwartet Vti1a, jedoch kein Vti1b detektiert werden.

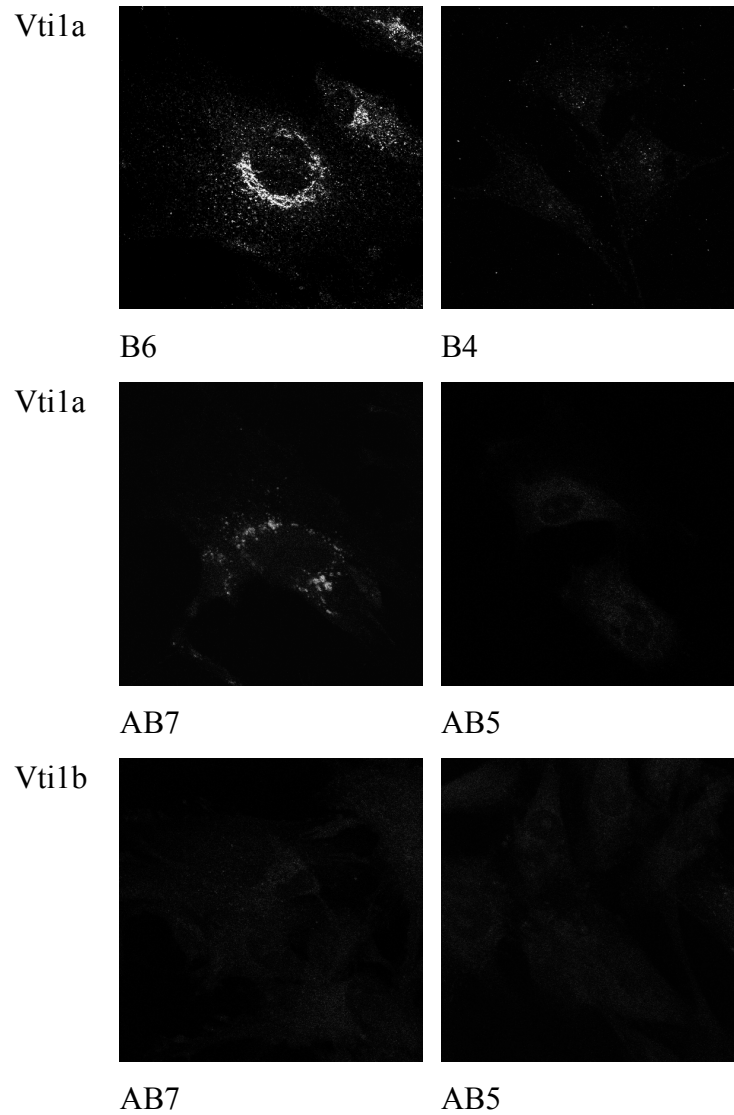


Abb. 23: Verteilung von Vti1a und Vti1b in Vti1a-defizienten und Vti1a/Vti1b-doppeldefizienten MEF

B6: Wildtyp MEF

B4: Vti1a-defiziente MEF

AB7: Vti1b-defiziente MEF

AB5: Vti1a/Vti1b-doppeldefiziente MEF

Die Färbung von Kontrollzellen (E1), Vti1a-heterozygoten (B1) und Vti1a-defizienten Zellen (B4) sowie von Vti1b/Endobrevin-doppeldefizienten Zellen (C7) mit GM130, einem Marker für den Golgi-Apparat, ließ keinen Unterschied erkennen. In den vier untersuchten Zelllinien wurde eine perinukleäre Golgi-typische Färbung beobachtet (Abb.24).

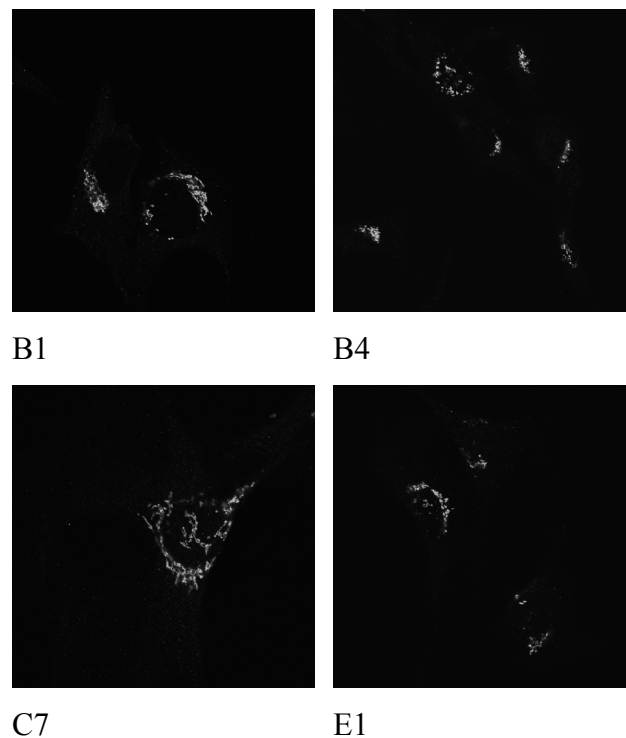


Abb. 24: Färbung von MEF mit dem Golgimarker GM130

B1: Vti1a-heterozygote MEF

B4: Vti1a-defiziente MEF

C7: Vti1b/Endobrevin-doppeldefiziente MEF

E1: Kontrollzellen

Es konnte kein Unterschied in der Verteilung von GM 130 in den untersuchten Zelllinien festgestellt werden.

Für die Färbung mit hMPR 46, einem Marker für endosomale Strukturen und das Trans-Golgi-Netzwerk, standen zusätzlich noch Vti1a/Vti1b-doppeldefiziente Zellen (AB5) und Vtib-defiziente Zellen (AB7) zur Verfügung. Kontrollzellen (B1, E1) sowie Vti1a-defiziente Zellen (B4) zeigen das für hMPR 46 typische halbmondähnliche perinukleäre

Färbemuster. Bei den AB5-Zellen ist eine deutliche Umverteilung von hMPR46 zu erkennen.

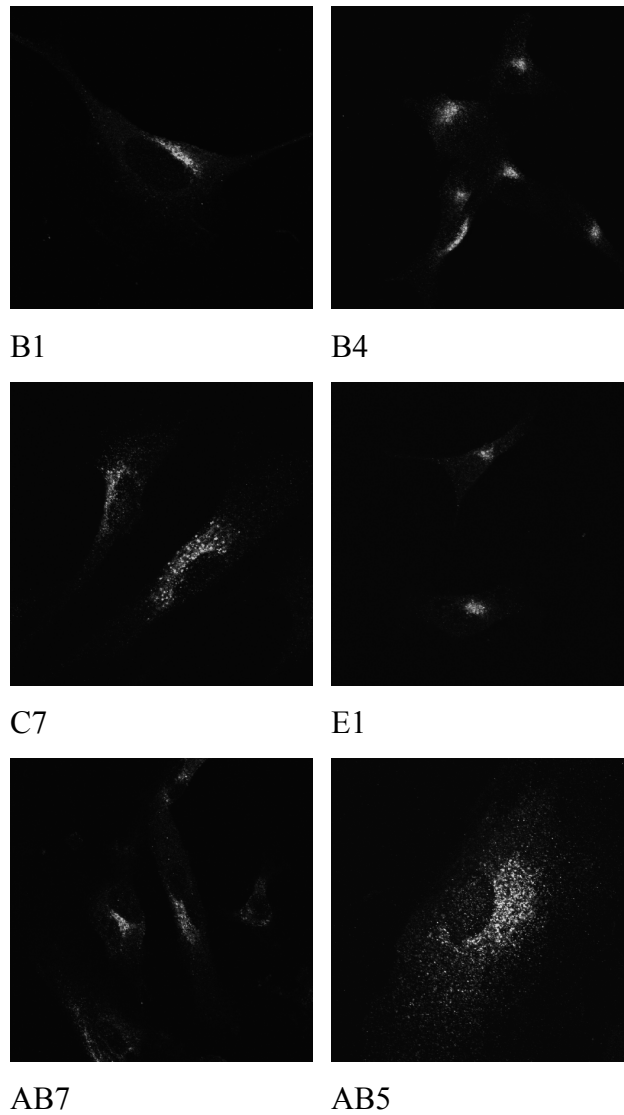


Abb. 25: Immunfluoreszenzen von verschiedenen MEF mit dem Trans-Golgi-Network-Marker hMPR46

B1: Vti1a-heterozygote MEF

B4: Vti1a-defiziente MEF

C7: Vti1b/Endobrevin-defiziente MEF

E1: Kontrollzellen

AB7: Vti1b-defiziente MEF

AB5: Vti1a/Vti1b-doppeldefiziente MEF

In Vti1a/Vti1b-doppeldefizienten Zellen konnte eine Umverteilung von hMPR 46 beobachtet werden.

Die Färbung ist mehr dispers über die gesamte Zelle verteilt (Abb.25) und ähnelt der Färbung von $\mu 1$ -defizienten Zellen mit hMPR 46 (MEYER et al., 2000). Dieses Ergebnis lässt den Schluss auf eine Umverteilung von MPR 46 in Vti1a/Vti1b-doppeldefizienten Zellen zu.

Um Hinweise auf die Verteilung von Vti1b in Vti1a-defizienten Zellen zu bekommen, wurden Doppelimmunofluoreszenzen von Kontrollzellen (B6) und Vti1a-defizienten Zellen (B4) mit Anti-Vti1b zusammen mit Anti-LAMP1 bzw. Anti-LAMP2, zwei Markern für späte Endosomen und Lysosomen, angefertigt. In der Verteilung von LAMP1 und LAMP2 konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die Verteilung von Vti1b weicht in Vti1a-defizienten Zellen von der typischen, hauptsächlich perinukleären, sowie peripher vesikulären Färbung von Vti1b in Kontrollzellen ab. Sie erscheint weniger perinukleär, dafür aber intensiver in den peripher vesikulären Strukturen. Die LAMP1/Vti1b- bzw. LAMP2/Vti1b-Doppelimmunofluoreszenzen verdeutlichen diesen Befund. Der in Abbildung 26 perinukleäre grüne Bereich von Vti1b ist in Vti1a-defizienten Zellen weniger intensiv, Kollokalisierungen mit LAMP1 bzw. LAMP2 sind stärker als in Kontrollzellen. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass Vti1b in Vti1a-defizienten Zellen umverteilt wird.

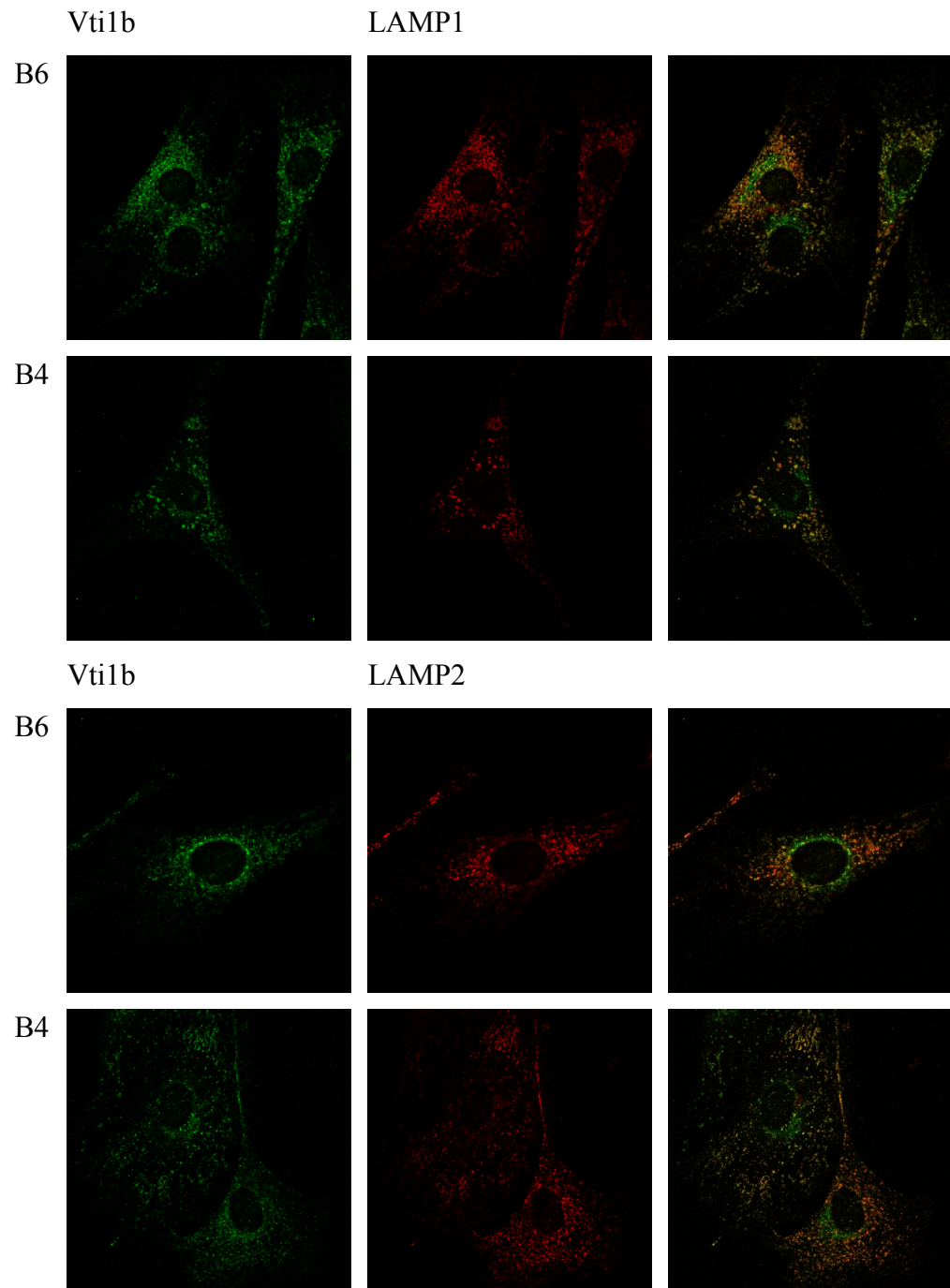


Abb. 26: Umverteilung von Vti1b in Vti1a-defizienten Zellen

MEF wurden mit Anti-Vti1b und Anti-LAMP1 bzw. Anti-LAMP2 doppelgefärbt.

B4: Vti1a-defiziente MEF

B6: Kontrollzellen

Es konnte eine Umverteilung von Vti1b in Vti1a-defizienten Zellen beobachtet werden.

Doppelimmunfluoreszenzen von Anti-Vti1a mit Anti-LAMP1 bzw. Anti-LAMP2 in Kontrollzellen lassen keine Kollokationen erkennen (Abb.27). Dieses Ergebnis ist eine weitere Bestätigung des Befunds, dass Vti1a nicht in späten endosomalen und lysosomalen Kompartimenten lokalisiert ist (KREYKENBOHM et al., 2003)

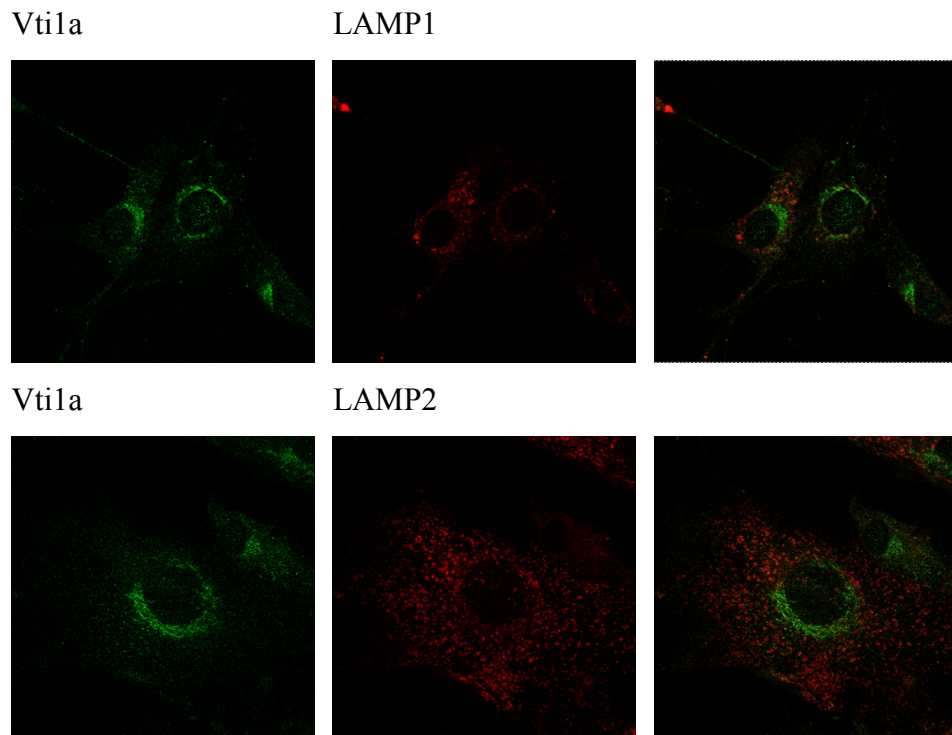


Abb. 27: Doppelimmunfluoreszenzen in Kontrollzellen (B6) mit Anti-Vti1a und Anti-LAMP1 bzw. Anti-LAMP2

Vti1a ist nicht mit späten endosomalen oder lysosomalen Kompartimenten assoziiert.

Mit Vti1a/Vti1b-doppeldefizienten Zellen (AB5) sowie Vti1b-defizienten Zellen (AB7) wurden Einzelfärbungen mit LAMP1 angefertigt. Es konnte kein Unterschied zur vesikulären LAMP1-Färbung in Wildtypzellen beobachtet werden (Abb.28).

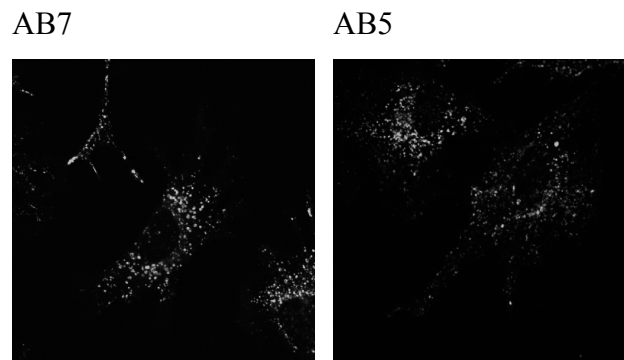


Abb. 28: LAMP1-Färbung in Vti1b-defizienten Zellen und in Vti1a/Vti1b-doppeldefizienten Zellen

AB7: Vti1b-defiziente MEF

AB5: Vti1a/Vti1b-doppeldefiziente MEF

LAMP1 Färbung von Vti1a/Vti1b-doppeldefizienten Zellen zeigt keinen Unterschied zu LAMP1 Färbungen in Kontrollzellen.

3.6.2 Rezeptorvermittelte Endozytose von fluoreszierendem LDL in MEF verschiedenen Genotyps

Die rezeptorvermittelte Endozytose von Proteinen ist der am besten charakterisierte Internalisierungsmechanismus in Säugerzellen. Beispiele für Liganden sind der epidermal growth factor (EGF) (DUNN und HUBBARD, 1984) und low-density Lipoproteins (LDL) (ANDERSON et al., 1976). LDL-Rezeptoren wurden auf fast allen menschlichen und tierischen Zellen gefunden. Sie befinden sich in speziellen Membranbereichen, den coated pits, die Clathrin enthalten. Nach der Bindung eines Liganden an den Rezeptor schnüren sich Clathrin-umhüllte Vesikel von der Plasmamembran ab. Nach der Dissoziation der Clathrin-Hülle vom endozytierten Vesikel wird das von der Zelle aufgenommene LDL in die frühen Endosomen transportiert, wo es aufgrund des niedrigen pHs vom Rezeptor dissoziiert und anschließend, nach Transport in die Lysosomen, degradiert wird. Der Rezeptor wird für weitere Internalisierungsrunden recycelt. Ein LDL-Rezeptor kann während seines 30 Stunden dauernden Lebens mehr als 150 LDL-Partikel internalisieren (BROWN et al., 1982). Die Untersuchung der LDL-Aufnahme in Zellen unterschiedlichen Genotyps, des Transports von LDL in frühe und späte

Endosomen und der Degradierung des LDL in Lysosomen kann wertvolle Hinweise auf Unterschiede in diesen Transportschritten geben.

Die Zellen wurden zunächst zwei Stunden in Hungermedium (ohne FKS) inkubiert. Die Aufnahme von fluoreszierend markiertem LDL erfolgte anschließend für 30 min bei 37°C (10µg/ml LDL in Hungermedium). Das Markermedium wurde nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS durch normales Medium ersetzt und die Zellen für verschiedene chase-Zeiten bei 37°C inkubiert.

In Vt1a-defizienten Zellen konnte im Vergleich mit Wildtypzellen eine Tendenz zu schnellerem Transport des internalisierten LDL in Lysosomen und schnellere Degradierung beobachtet werden. Während nach 30 min chase in Wildtypzellen hauptsächlich Strukturen zu finden waren, die frühen Verteilungsmustern entsprechen, waren in Vt1a-defizienten Zellen weitaus mehr größere, lysosomalen Verteilungsmustern entsprechende Vesikel ausmachbar. Die Signalreduktion, hervorgerufen durch lysosomale Degradierung des LDL, war nach 4,5 Stunden chase in Vt1a-defizienten Zellen fortgeschrittener als in Kontrollzellen (Abb.29). Dieser Befund lässt eine Beschleunigung des Transports von endocytierten Vesikeln zum späten Endosom in Vt1a-defizienten Zellen vermuten.

Beim Vergleich von Vt1a/Vt1b-doppeldefizienten Zellen mit Vt1b-defizienten Zellen konnte kein nennenswerter Unterschied festgestellt werden. Bei beiden Zelllinien konnte nach 4,5 Stunden chase eine Signalreduktion beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass LDL in Vt1a/Vt1b-defizienten Zellen die Lysosomen erreicht und dort degradiert wird (Abb.30). V.Atashkin untersuchte in seiner Dissertation die LDL-Aufnahme in der Vt1b-defizienten Zelllinie E5. Er konnte keinen Unterschied zu Wildtypzellen erkennen (ATLASHKIN, 2002). Aus diesen Ergebnissen sowie aus dem Vergleich mit Wildtypzellen aus anderen Versuchen (Abb.29) kann geschlossen werden, dass Aufnahme, Transport und Degradierung von LDL in Vt1a/Vt1b-defizienten Zellen nicht beeinträchtigt wird.

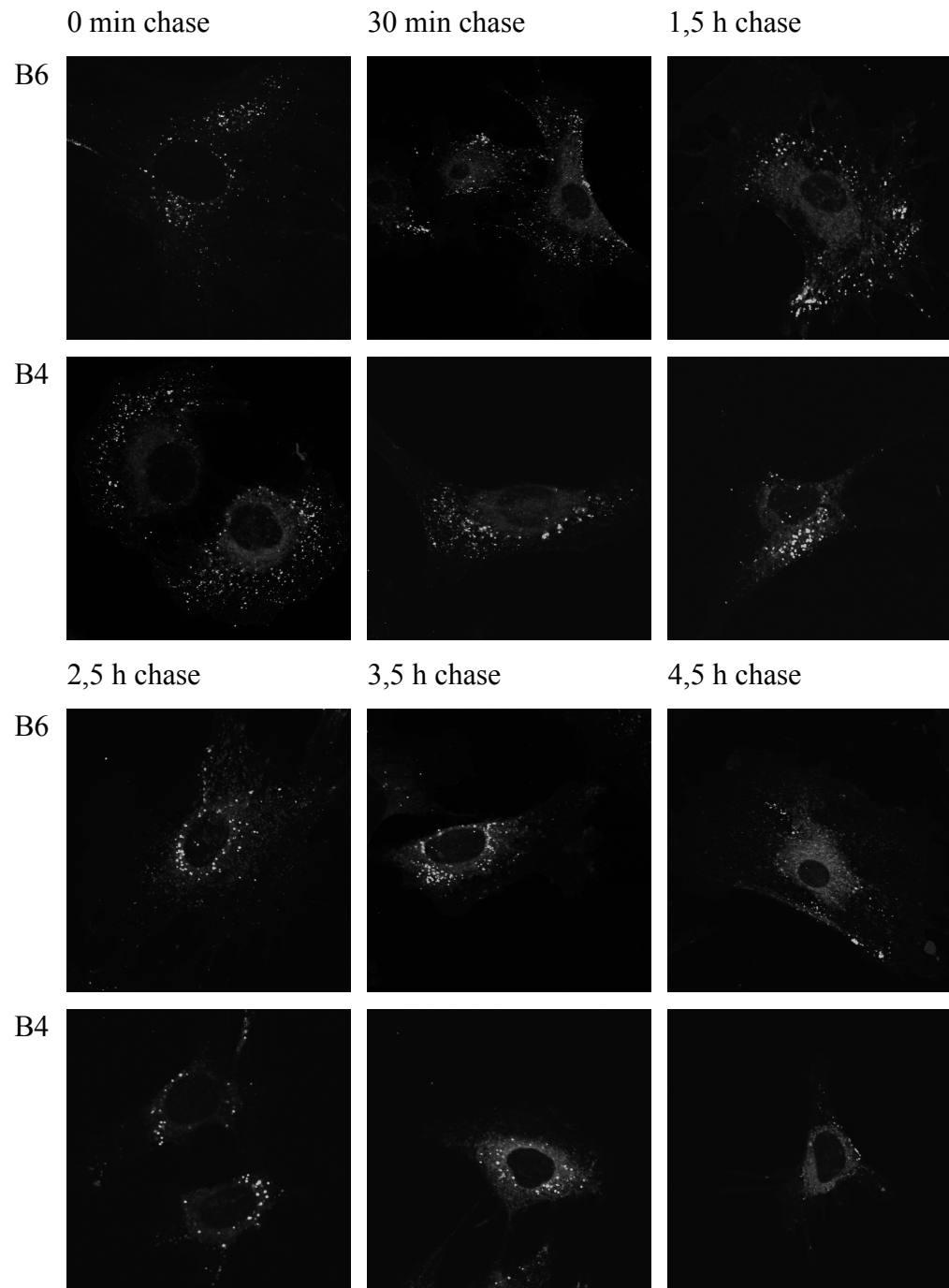


Abb. 29: LDL-Aufnahme und Degradierung in Wildtypzellen (B6) und *Vt1a*-defizienten Zellen (B4)
Beide Zelllinien waren durch wiederholtes Passagieren immortalisiert worden. Transport von LDL in lysosomale Kompartimente ist in *Vt1a*-defizienten Zellen schneller als in Wildtypzellen.

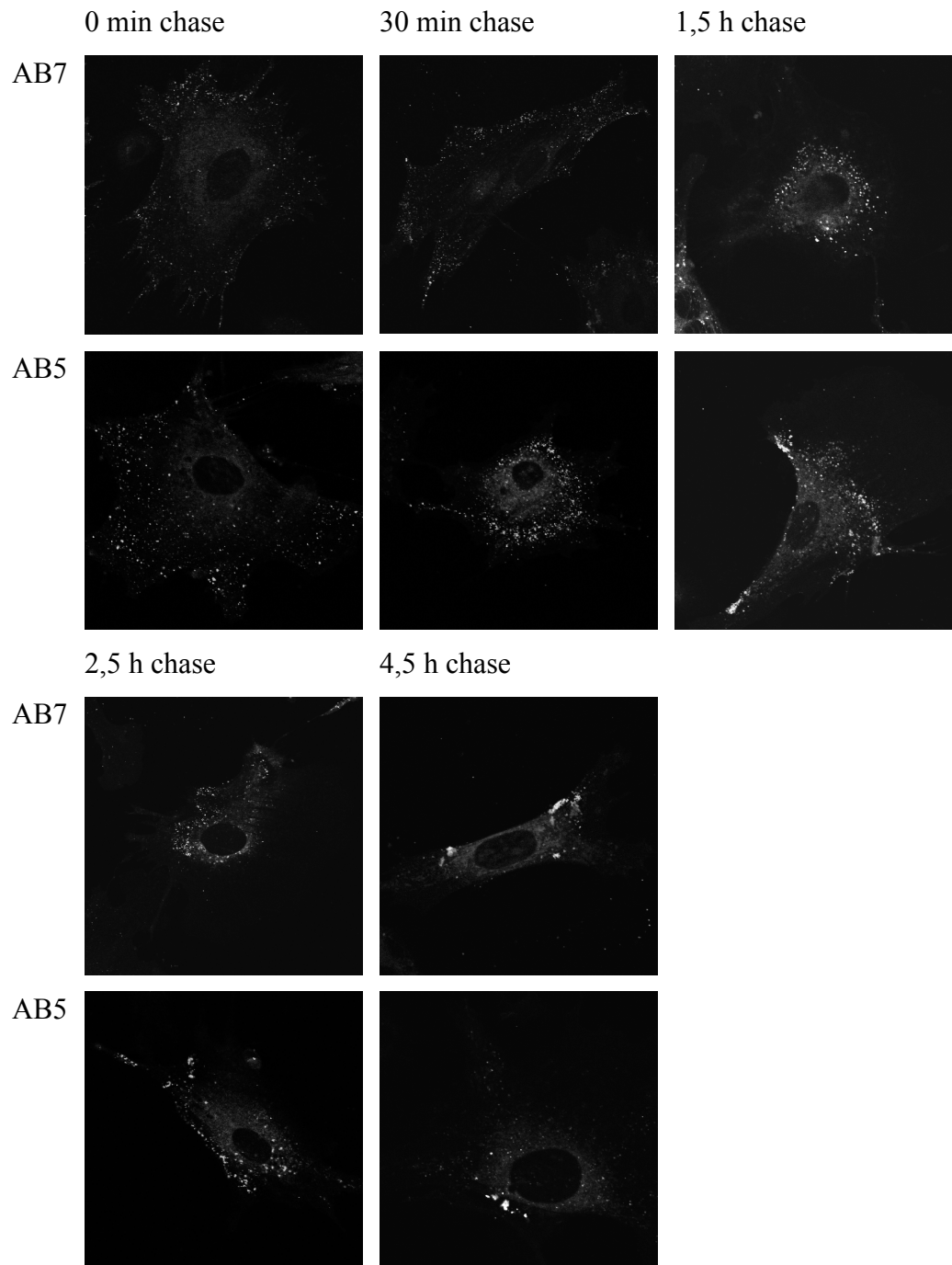


Abb. 30: LDL-Aufnahme und Degradierung in Vti1a/Vti1b-doppelfdefizienten (AB5) und Vti1b-defizienten Zellen (AB7)

Für diesen Versuch wurden frühe, nicht immortalisierte Passagen der Zelllinien benutzt. Endozytose, Transport und Degradierung von LDL wird in Vti1a/Vti1b-defizienten Zellen nicht beeinträchtigt.

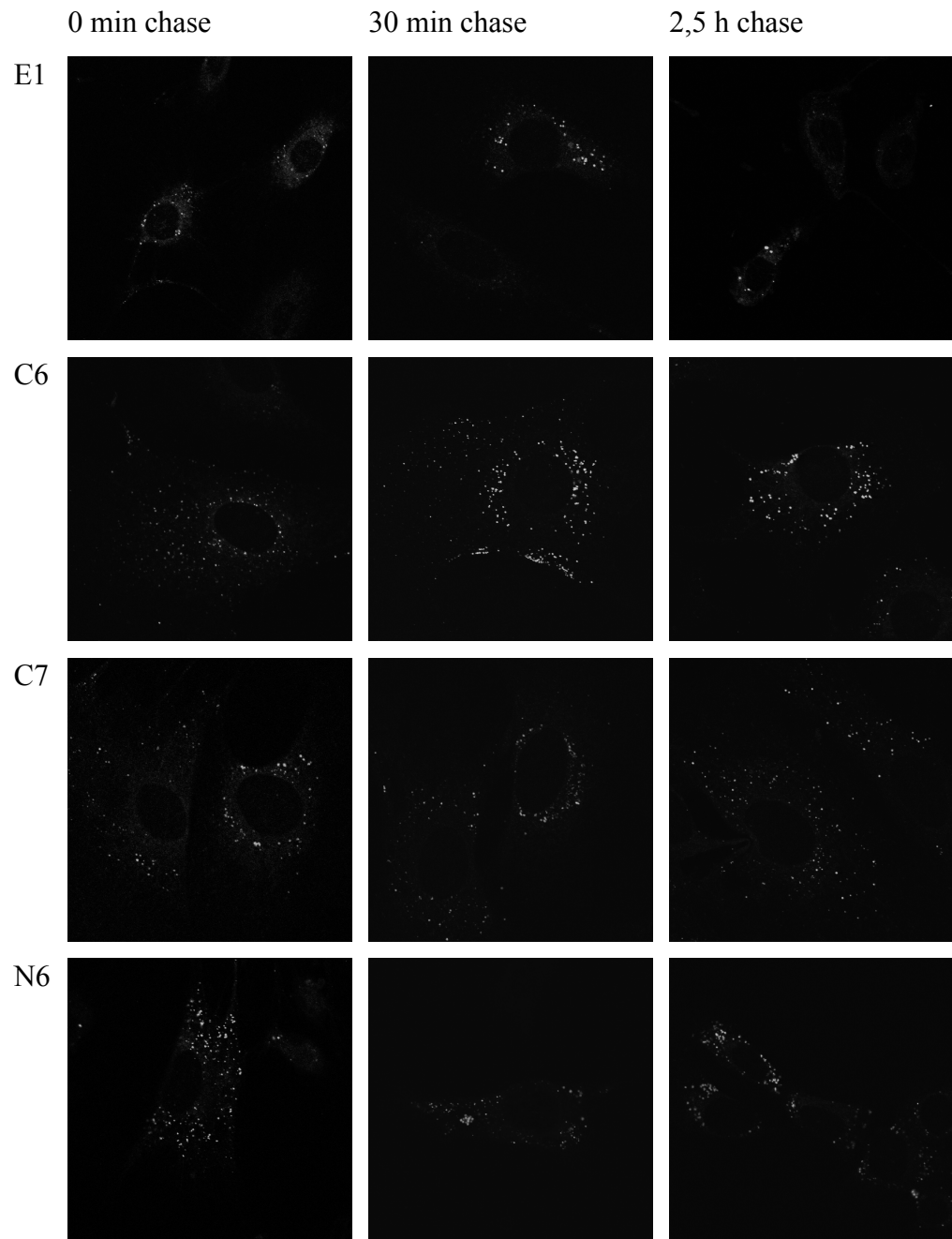


Abb. 31: LDL-Aufnahme und Degradierung in Kontrollzellen (E1), Endobrevin-defizienten MEF (C6) sowie Endobrevin/Vti1b-doppeldefizienten MEF(C7, N6)

Die benutzten Zelllinien waren durch wiederholtes Passagieren immortalisiert worden. Der Transport von LDL ist in Endobrevin/Vti1b-doppeldefizienten Zellen verlangsamt.

Der Vergleich von Endobrevin-defizienten und Endobrevin/Vti1b-doppeldefizienten Zellen mit Wildtyp-MEF zeigte eine Verlangsamung des Transports von LDL in lysosomale Kompartimente. Während sich in Kontrollzellen nach 2,5 Stunden der Hauptanteil des endocytierten LDL in größeren lysosomalen Strukturen befindet, ist es vor allem in Endobrevin/Vti1b-doppeldefizienten Zellen und in etwas geringerem Ausmaß in Endobrevin-defizienten Zellen in Strukturen verteilt, die den Verteilungsmustern des LDL in frühen Stadien bei Kontrollzellen gleichen (Abb.31 sowie Abb.29). Dieses Ergebnis lässt auf einen Defekt im Transport von LDL zu den späten Endosomen und Lysosomen schließen.

3.6.3 Fluid Phase-Uptake von FITC-Dextran in MEF verschiedenen Genotyps

Zur Untersuchung der endosomalen/lysosomalen Strukturen während der Endozytose von extrazellulärer Flüssigkeit wurde die Verteilung von internalisiertem Fluorescein Isothiocyanat-markiertem Dextran (FITC-Dextran) untersucht. Dieser Marker wird von Zellen aufgenommen, ohne von Membranen absorbiert zu werden. FITC-Dextran wird in Lysosomen nicht degradiert (THILO und VOGEL, 1980; de CHASTELLIER et al., 1983; KLEIN und SATRE, 1986).

Zellen, die zu 60-70% konfluent waren wurden mit PBS gewaschen und anschließend für unterschiedliche Zeiten mit FITC-Dextran bei 37°C inkubiert, danach nochmals gewaschen, fixiert und mikroskopisch analysiert.

Kontrollzellen, Vti1a-defiziente Zellen, Vti1b-defiziente Zellen sowie Vti1a/Vti1b-doppeldefiziente Zellen zeigten keinen erkennbaren Unterschied in Aufnahme und Transport von FITC-Dextran (Abb.32 und Abb.33). In allen untersuchten Zelllinien gelangte das internalisierte FITC-Dextran nach einer Stunde in größere lysosomale Strukturen und sammelte sich dort an (3 h Wert). Aufnahme und Transport von FITC-Dextran ist somit nicht oder nicht genug beeinträchtigt um einen sichtbaren Effekt zu zeigen.

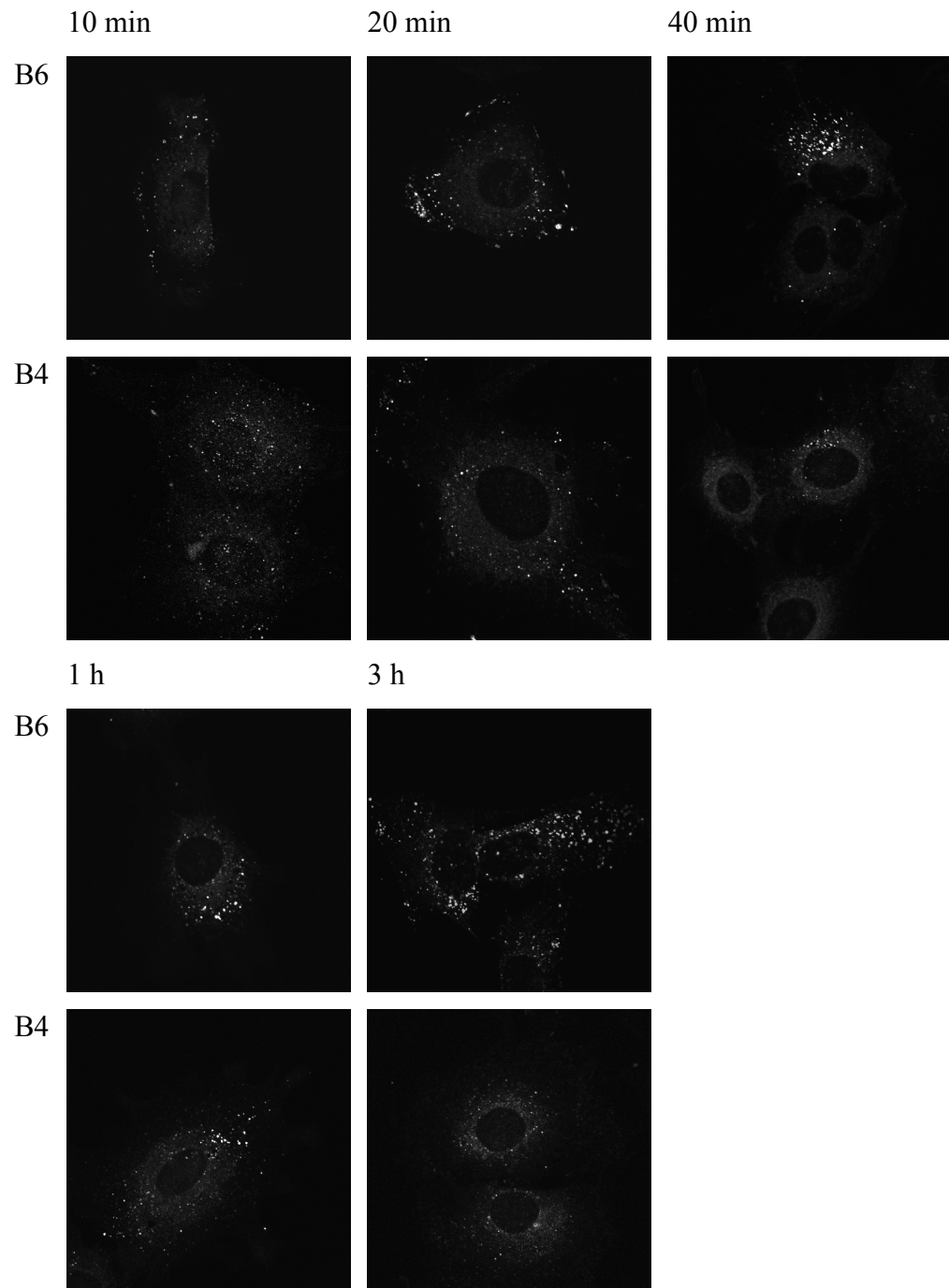


Abb. 32: FITC-Dextran Aufnahme und Transport in Vti1a-defizienten Zellen

B6: Wildtyp-MEF

B4: Vti1a-defiziente MEF

Es konnte kein Unterschied in Aufnahme und Transport von FITC-Dextran in Vti1a-defizienten MEF verglichen mit Kontrollzellen festgestellt werden.

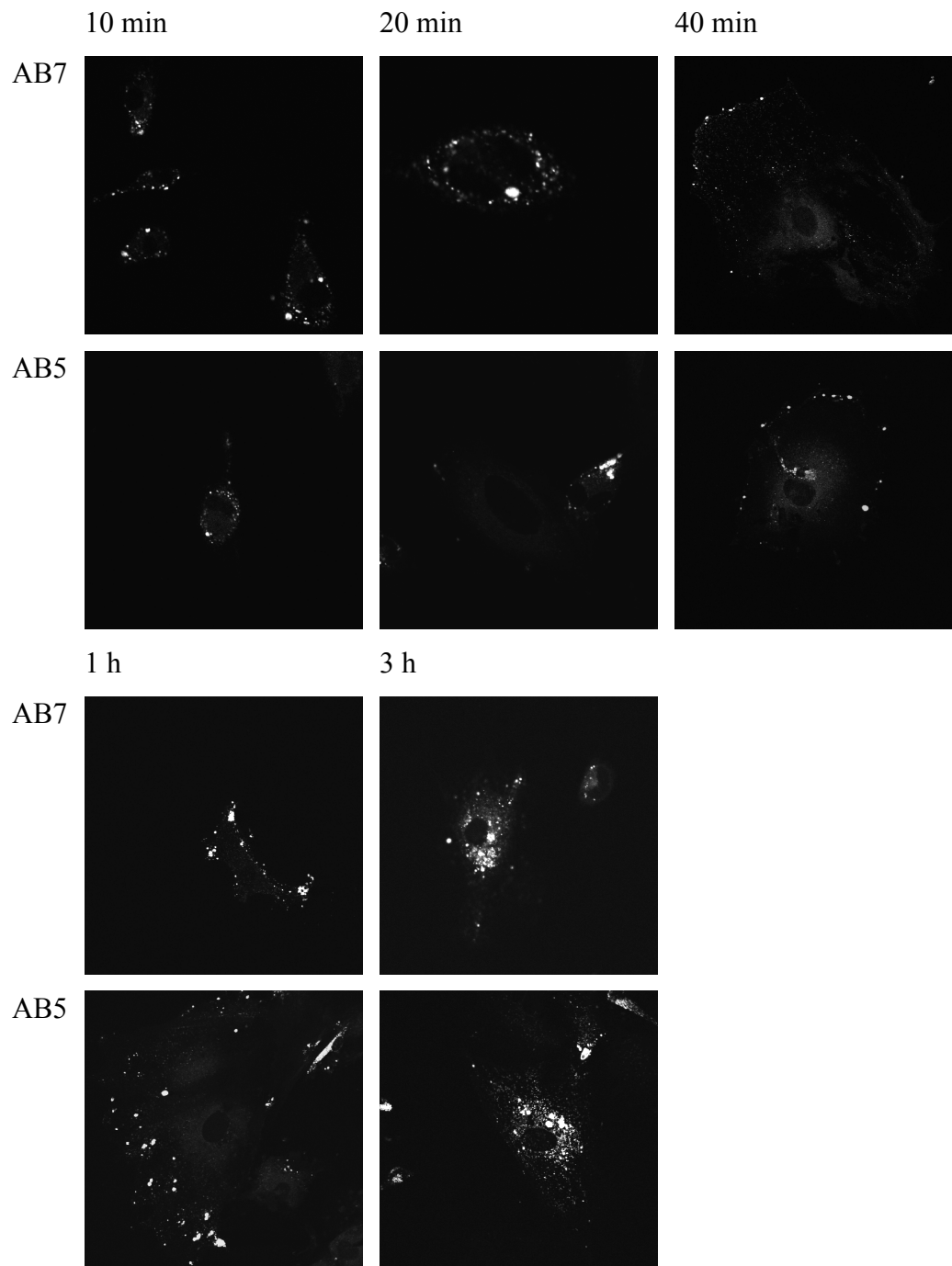


Abb. 33: FITC-Dextran Aufnahme und Transport in Vti1a/Vti1b-doppeldefizienten und Vti1b-defizienten Zellen

AB7: Vti1b-defiziente Zellen

AB5: Vti1a/Vti1b-doppeldefiziente MEF

Es konnte kein Unterschied in Aufnahme und Transport von FITC-Dextran in Vti1a/Vti1b-doppeldefizienten MEF verglichen mit Vti1b-defizienten Zellen festgestellt werden.

3.6.4 Fluid Phase-Uptake von Avidin in MEF verschiedenen Genotyps

Dieser mikroskopische Assay wurde ursprünglich zur Untersuchung der optimalen Markierungszeiten für späte Endosomen für den Endosomenfusionsassay entwickelt. Bei der Untersuchung von MEF unterschiedlichen Genotyps liefert er, ebenso wie der LDL-Uptake und der FITC-Dextran-Uptake wichtige Informationen über Unterschiede im Transport des Markers. Zellen, die zu 60-70% konfluent waren, wurden zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend für 20 min mit markerhaltigem Medium bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Zellen für unterschiedliche chase-Zeiten bei 37°C inkubiert. Auf diese Markierung von Zellkompartimenten mit Avidin folgte die Anfärbung mittels Doppelimmunofluoreszenz von Avidin und LAMP1, einem Marker für späte Endosomen und Lysosomen, um anhand des Verteilungsmusters von LAMP1 die zeitabhängige Veränderung der Verteilung von Avidin beurteilen zu können.

LAMP1 zeigte in allen untersuchten Zelllinien ein charakteristisches Verteilungsmuster. In Kontrollzellen (B6, E1), *Vti1b*-defizienten Zellen (E5) als auch in Endobrevin-defizienten Zellen (C6) konnten die meisten Kollokalisierungen von Avidin und LAMP1 nach 1 Stunde chase beobachtet werden (Abbildungen 34, 35, 37 und 38). Das bedeutet, dass der Hauptanteil des endozytierten Avidins nach einer Stunde späte endosomale und lysosomale Kompartimente erreicht hat. In Kontrollzellen sind diese Kollokalisierungen häufiger als in *Vti1b*-defizienten und Endobrevin-defizienten Zellen. Für die Zelllinien E1 und E5 waren also die gewählten Markierungszeiten im Endosomenfusionsassay korrekt gewählt.

In *Vti1a*-defizienten Zellen (B4) waren schon nach 30 min chase Kompartimente zu finden, die sowohl LAMP1 als auch Avidin enthielten (Abb.36). Das Ergebnis bestätigt die Befunde des LDL-Endozytose und spricht dafür, dass endozytierte Vesikel dieser Zellen späte Endosomen sowie Lysosomen früher erreichen als in Wildtypzellen. Bei Verwendung dieser Zellen für das Endosomenfusionsassay würden sich also Markierungszeiten von 20 min pulse und 30 min chase empfehlen.

In Endobrevin/*Vti1b*-doppelfdefizienten Zellen (C7, N6) konnten nach 3 Stunden chase die meisten Kollokalisierungen beobachtet werden (Abbildungen 39 und 40). Der Transport von endozytiertem Marker in späte Endosomen und Lysosomen ist in diesen Zelllinien

verlangsamt. Für Endobrevin/Vti1b-doppeldefiziente Zellen ist dieses Ergebnis eine Bestätigung der Befunde des LDL-Uptakes. Für den in vitro Fusionsassay bedeutet dieses Ergebnis, dass sich die endozytierten Marker bei gleichen chase-Zeiten, aber unterschiedlichen Genotypen der Zelllinien, in verschiedenen Zellkompartimenten befinden können. So befinden sich die Marker nach einer Stunde chase in Endobrevin/Vti1b-doppeldefizienten MEF hauptsächlich in LAMP1-negativen Vesikeln, während in Wildtypzellen die meisten Kollokalisierungen beobachtet werden konnten.

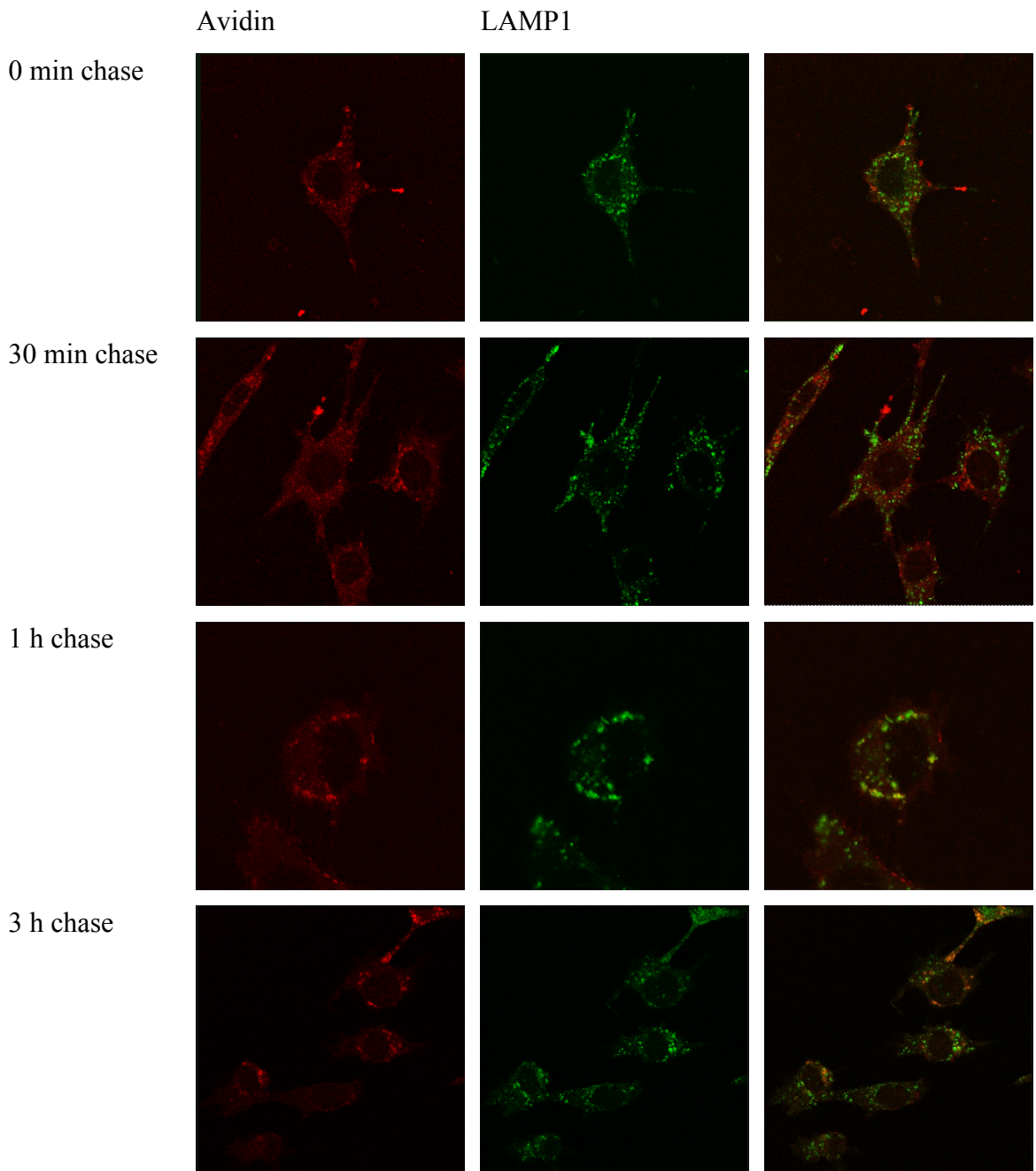


Abb. 34: Avidinaufnahme in Kontrollzellen (B6)

Die Zellen wurden für unterschiedliche Zeiten mit Avidin markiert und anschließend mit Anti-Avidin und Anti-LAMP1 doppelgefärbt. Die meisten Kollokalisierungen sind nach 1 h zu beobachten.

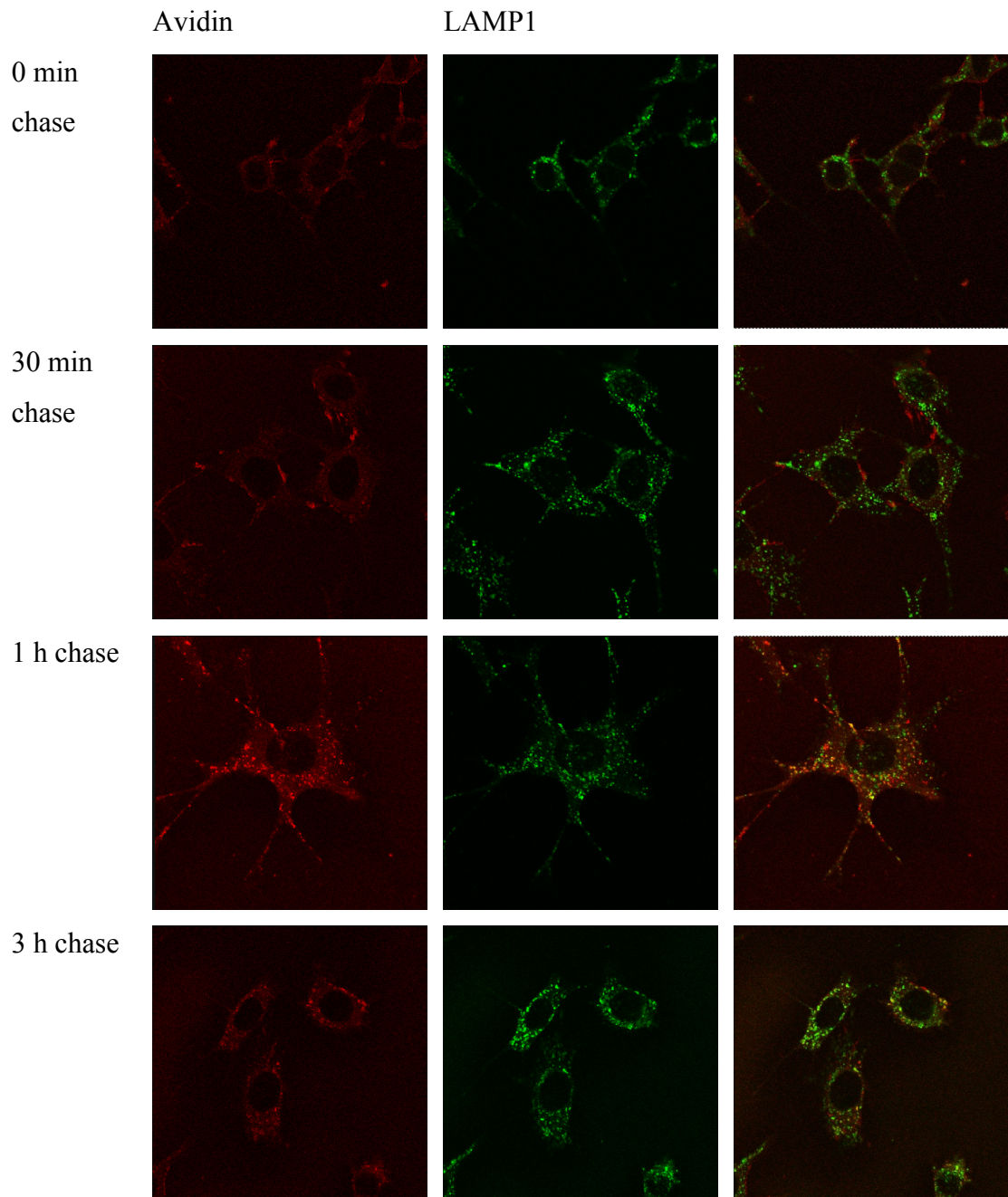


Abb. 35: Avidinaufnahme in Kontrollzellen (E1)

Die Zellen wurden für unterschiedliche Zeiten mit Avidin markiert und anschließend mit Anti-Avidin und Anti-LAMP1 doppelgefärbt. Die meisten Kolokalisationen sind nach 1 h zu beobachten.

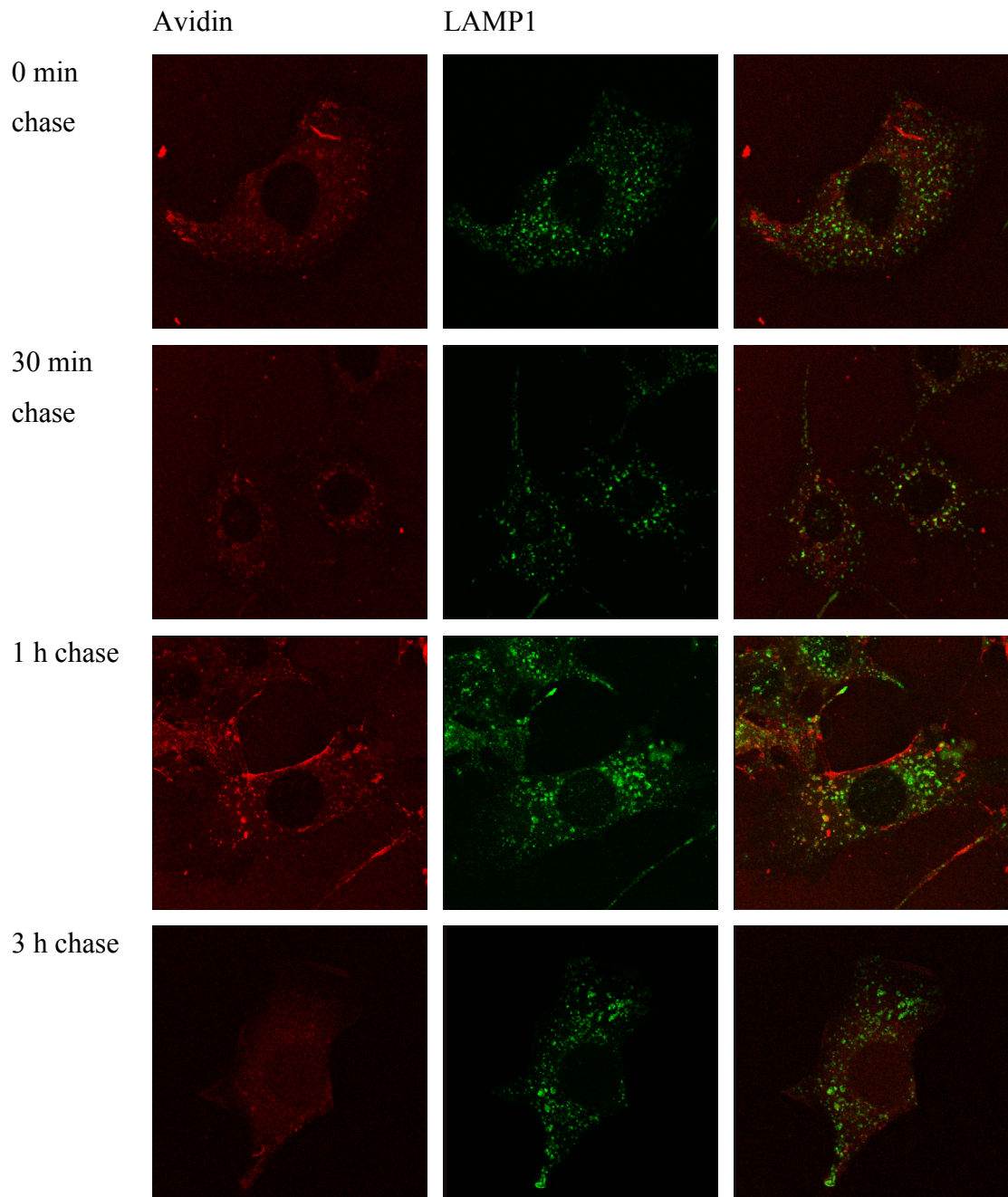


Abb. 36: Avidinaufnahme in Vti1a-defizienten Zellen (B4)

Die Zellen wurden für unterschiedliche Zeiten mit Avidin markiert und anschließend mit Anti-Avidin und Anti-LAMP1 doppelgefärbt. Kolokalisationen sind schon nach 30 min zu beobachten.

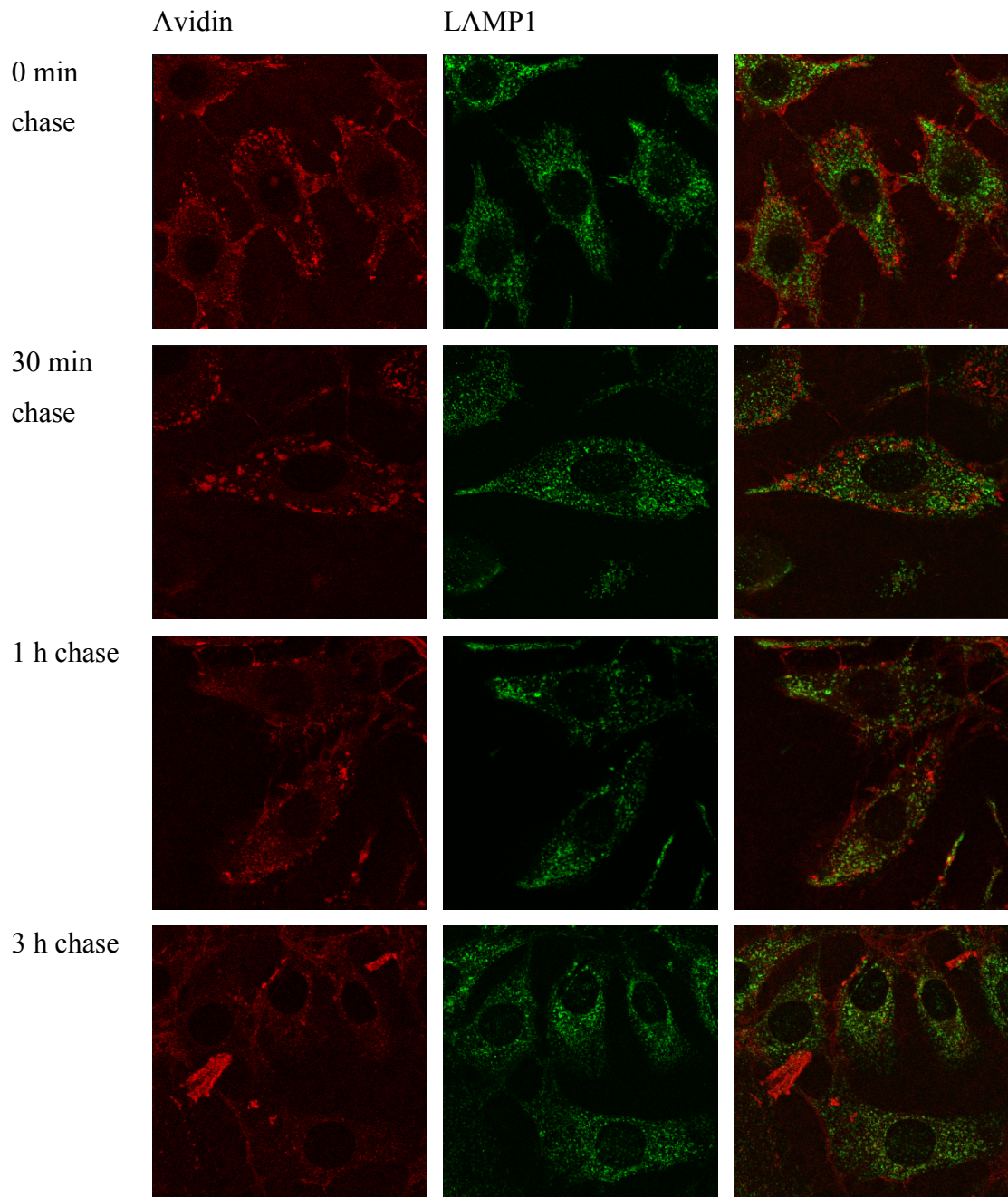


Abb. 37: Avidinaufnahme in Vti1b-defizienten Zellen (E5)

Die Zellen wurden für unterschiedliche Zeiten mit Avidin markiert und anschließend mit Anti-Avidin und Anti-LAMP1 doppelgefärbt. Die meisten Kollokalisierungen sind nach 1 h zu beobachten.

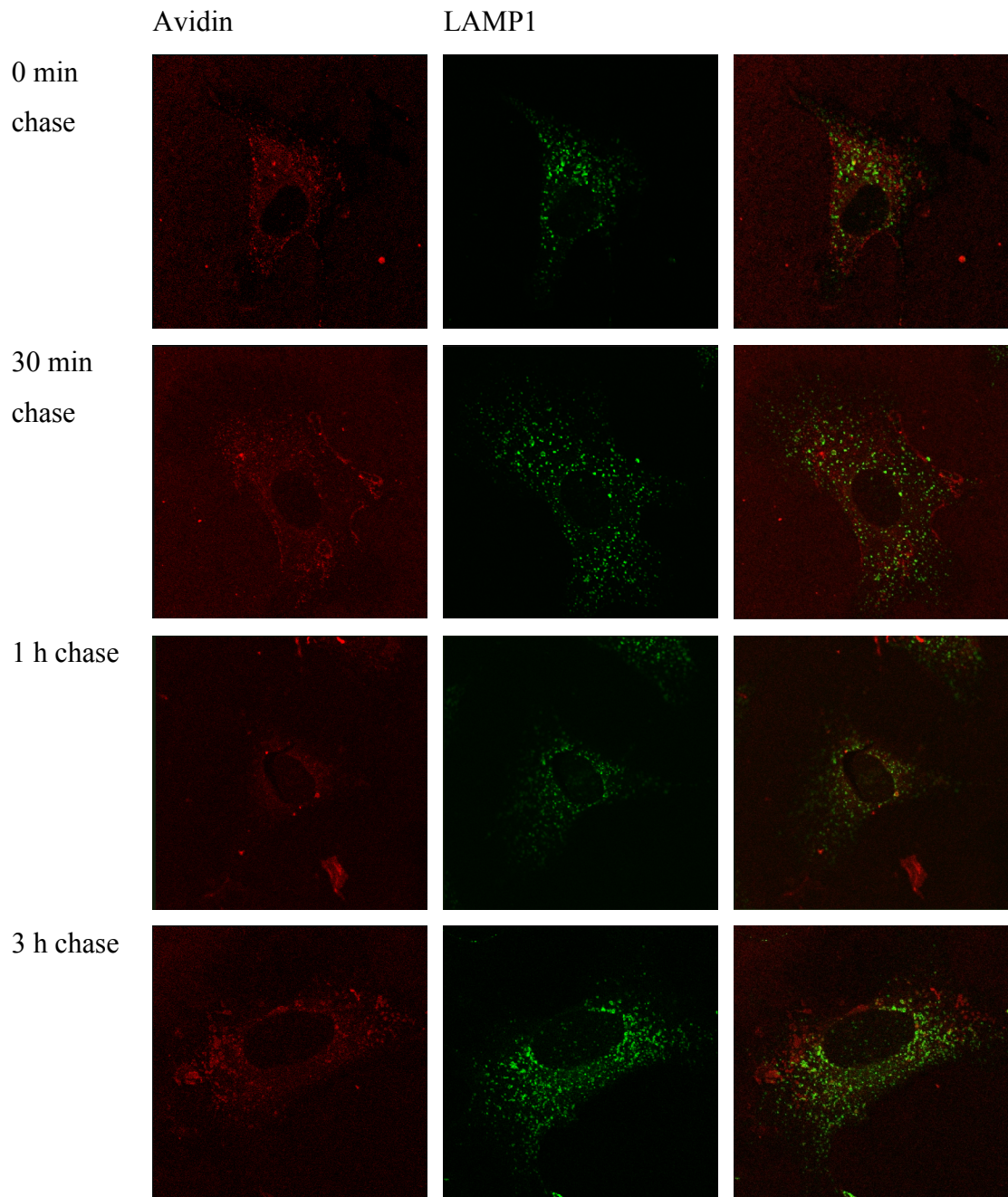


Abb. 38: Avidinaufnahme in Endobrevin-defizienten Zellen (C6)

Die Zellen wurden für unterschiedliche Zeiten mit Avidin markiert und anschließend mit Anti-Avidin und Anti-LAMP1 doppelgefärbt. Die meisten Kolokalisationen sind nach 1 h zu beobachten

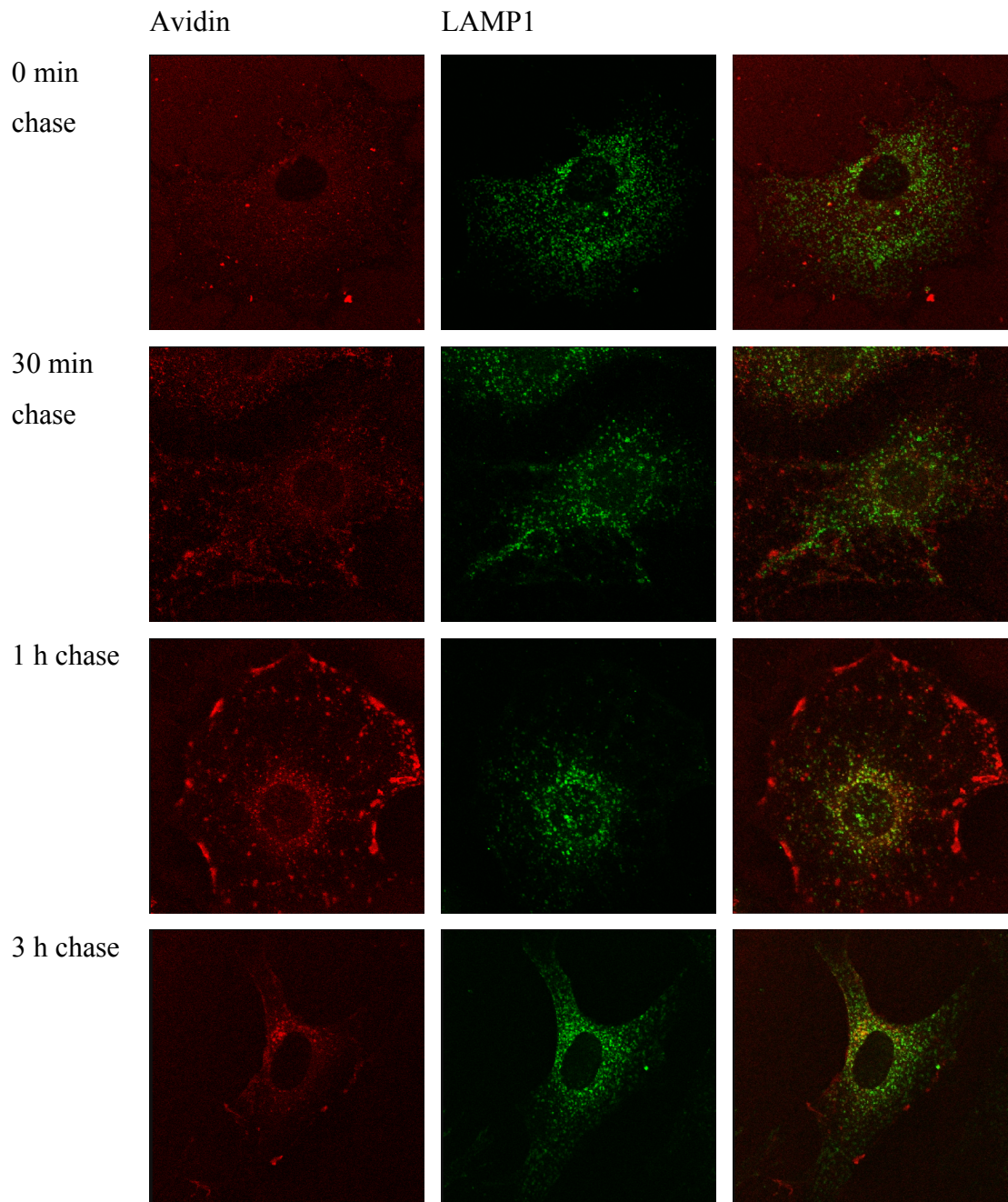


Abb. 39: Avidinaufnahme in Vti1b/Endobrevin-doppeldefizienten Zellen (C7)

Die Zellen wurden für unterschiedliche Zeiten mit Avidin markiert und anschließend mit Anti-Avidin und Anti-LAMP1 doppelgefärbt. Die meisten Kolokalisationen sind nach 3 h zu beobachten.

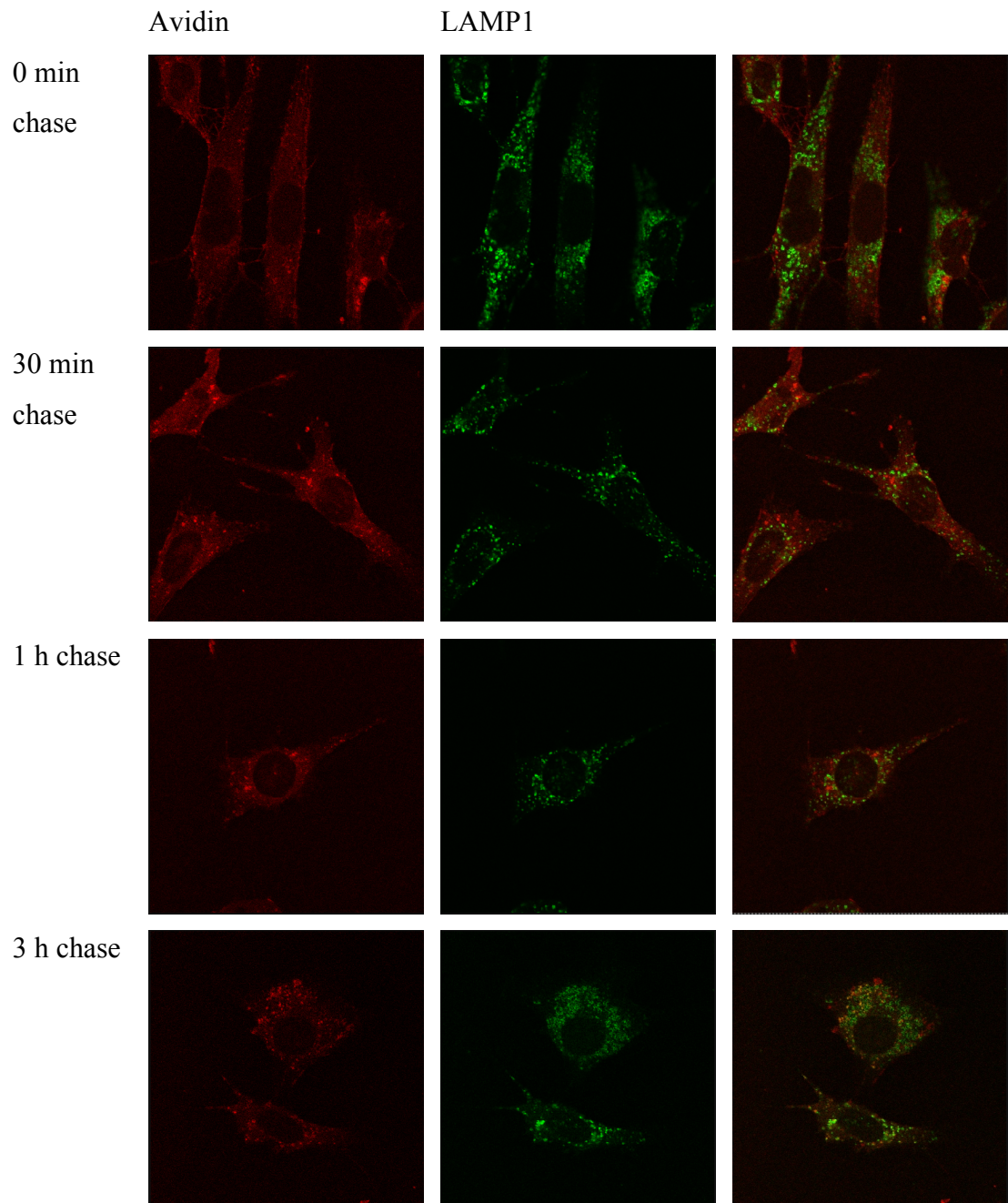


Abb. 40: Avidinaufnahme in Vti1b/Endobrevin-doppeldefizienten Zellen (N6)

Die Zellen wurden für unterschiedliche Zeiten mit Avidin markiert und anschließend mit Anti-Avidin und Anti-LAMP1 doppelgefärbt. Die meisten Kollokalisierungen sind nach 3 h zu beobachten.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung eines SNARE-Komplexes bestehend aus Vti1a, Syntaxin 6, Syntaxin 16 und VAMP4

Immunopräzipitationen haben gezeigt, dass Vti1a sowohl das cis-Golgi-SNARE Syntaxin 5 als auch das trans-Golgi-SNARE Syntaxin 6 koimmunopräzipitiert. Allerdings waren Syntaxin 5 und Syntaxin 6 nicht Bestandteil des gleichen SNARE-Komplexes (XU et al., 1998). Es ist also möglich, dass Vti1a in mehreren SNARE-Komplexen benötigt wird. Auch die Koimmunopräzipitation von Syntaxin 6 und dem TGN-Protein VAMP4 (STEEGMAIER et al., 1999) und von Vti1a (Qb-SNARE), Syntaxin 6 (Qc-SNARE) und VAMP4 (R-SNARE) ist nachgewiesen worden (KREYKENBOHM, 2001). Aufgrund der Annahme, dass SNARE-Komplexe aus vier Helices bestehen, die noch in Qa-, Qb-, Qc- und R-Helices bzw. -SNAREs unterteilt werden, war ein Ziel der vorliegenden Dissertation, den vierten fehlenden Komplexpartner zu identifizieren. Mögliche Kandidaten waren die Qa-SNAREs Syntaxin 13, das frühen und recycling Endosomen zugeordnet wird (TANG et al., 1998; PREKERIS et al., 1998) und Syntaxin 16, welches am Golgi-Apparat lokalisiert ist (SIMONSEN et al., 1998). Mittels Immunopräzipitationen mit immobilisiertem Antiserum gegen Vti1a konnten aus solubilierten Hirnsynaptosomen Syntaxin 6, VAMP4 und Syntaxin 16 nachgewiesen werden. Immobilisiertes Antiserum gegen Syntaxin 16 koimmunopräzipitierte Vti1a und Syntaxin 6 und mit immobilisierten Antikörpern gegen Syntaxin 6 konnte Vti1a koimmunopräzipitiert werden. Syntaxin 13 konnte nicht nachgewiesen werden, aber es ist möglich, dass geringe koimmunopräzipitierte Mengen einer Detektion entgingen. Diese Daten sprechen klar für einen SNARE-Komplex bestehend aus Vti1a (Qb-SNARE), Syntaxin 6 (Qc-SNARE), Syntaxin 16 (Qa-SNARE) und VAMP4 (R-SNARE) und sind eine zusätzliche Unterstützung für die Hypothese, dass SNARE-Komplexe in ihrer Struktur konserviert sind. Der Hypothese zu Folge formen vier SNARE-Motive ein Vier-Helix-Bündel, dessen nach innen gerichteten Aminosäuren zur Stabilität des gebildeten SNARE-Komplexes beitragen. Die hochkonservierte ionic 0-layer, die von drei

Glutamin- und einem Argininrest gebildet wird, ist durch ionische Interaktionen charakterisiert. Bei Maus- und Ratten-Vti1a findet sich anstelle des Glutamins ein Aspartatrest, der aber ebenfalls in der Lage ist, starke ionische Interaktionen in der ionic 0-layer auszuüben. Alle weiteren, ins innere des Vier-Helix-Bündels weisenden Aminosäuren stabilisieren den Komplex durch hydrophobe Interaktionen und sind ebenfalls hochkonserviert. Die von der ionic 0-layer N-terminal-liegende -3-Layer besteht beim hier identifizierten Komplex aus den Aminosäuren Glycin (Vti1a), Serin (Syntaxin6), Methionin (VAMP4) und Phenylalanin (Syntaxin 16), also aus je zwei kleinen und zwei großen Aminosäuren, genau wie beim neuronalen SNARE-Komplex und beim SNARE-Komplex mit Vti1b, der an homotypischer, später endosomaler Fusion beteiligt ist (ANTONIN et al., 2000b).

Der hier identifizierte Komplex ist durch Daten einer weiteren Studie bestätigt worden. Ebenfalls mittels Koimmunopräzipitationen wurden Interaktionen von Vti1a, Syntaxin 6 und Syntaxin 16 mit entweder VAMP3 oder VAMP4, nicht jedoch mit VAMP7 oder VAMP8 nachgewiesen. Unpublizierte Daten derselben Studie sollen zeigen, dass Syntaxin 6, nicht jedoch Syntaxin 5 eine Bindung von Syntaxin 16 an GST-VAMP4 unterstützt (MALLARD et al., 2002). Auch ein SNARE-Komplex aus Hefe, der unter anderem aus Vti1p, Tlg1p (homolog zu Syntaxin 6) und Tlg2p (homolog zu Syntaxin 16) besteht und an der Endocytose sowie am Vesikeltransport zwischen frühen Endosomen und dem TGN beteiligt ist (PELHAM, 1999), spricht für die Relevanz der hier ermittelten Daten.

4.2 In vitro-Endosomenfusionsassay

Da Vti1a und Vti1b in frühen bzw. späten endosomalen Fusionen ihre Funktion ausüben (ANTONIN et al., 2000b), sollte ein vitro-Endosomenfusionsassay als Methode etabliert werden, um in Maus-embryonalen Fibroblasten verschiedenen Genotyps die Vesikelfusionen zu untersuchen. Das Endosomenfusionsassay basiert auf der Aufnahme von zwei verschiedenen Markern (Avidin und bHRP) in frühe (5 min pulse) oder späte (20 min pulse gefolgt von 60 min chase) Endosomen. Nach der in vitro-Fusion von

Endosomen bilden Avidin und bHRP ein immunoisolierbares Präzipitat, dessen HRP-Aktivität quantifizierbar ist (GRUENBERG et al., 1991; HOLROYD, 2001).

Zunächst wurden die für Maus-embryonale Wildtyp-Fibroblasten optimalen Bedingungen für die Präparation eines fusionsfähige Endosomen enthaltenden postnuklearen Überstandes ermittelt. Die besten Werte für HRP-Aktivitäten in pelletierten Membran des PNS wurden durch folgende Homogenisierungsbedingungen erhalten: Die 1:4 mit Homogenisierungspuffer verdünnten Zellen wurden 10 Mal durch einen Kugelhomogenisator aus Stahl mit einem Innendurchmesser von 0,2501 Zoll passagiert. Die dafür benutzte Kugel hatte einen Durchmesser von 0,2489 Zoll. Das erhaltene Zellhomogenat wurde anschließend 5 min bei 2500 Upm zentrifugiert. Der Überstand (PNS) wurde nach Bestimmung von HRP-Aktivität und Proteinmenge für Versuche verwendet.

Bei der Bestimmung der HRP-Aktivität im Membranpellet von Präparationen später Endosomen aus Endobrevin/Vti1b-doppeldefizienten Zellen fiel auf, dass die ermittelten Werte niedriger waren als für Präparationen früher und später Endosomen von Zellen anderer Genotypen. Normalerweise wurden immer HRP-Aktivitäten von 65-75% erzielt. Bei den Endobrevin/Vti1b-doppeldefizienten MEF lag der beste Wert bei 51%, der Durchschnitt lag bei ca. 35%. Niedrige HRP-Aktivitäten im Membranpellet sind ein Hinweis darauf, dass die Zellen und ihre Organellen zu stark homogenisiert wurden. Optimierungsversuche mit weniger Passagen und kleineren Kugeln für den Homogenisator brachten aber keine besseren Ergebnisse. Diese Resultate lassen vermuten, dass die späten Endosomen Endobrevin/Vti1b-doppeldefizienter MEF vielleicht eine andere Morphologie aufweisen und deswegen empfindlicher sind. Andererseits wäre es aber auch möglich, dass endozytierte Marker auf ihrem Weg vom frühen Endosom zum Lysosom in endosomale Carriervesikel gelangen, welche aufgrund der Endobrevin/Vti1b-Doppeldefizienz vielleicht in ihrer Fähigkeit behindert sind, mit späten Endosomen zu verschmelzen. Diese endosomalen Carriervesikel knospen vom frühen Endosom ab, werden entlang von Mikrotubuli durch das Zytoplasma transportiert und fusionieren dann mit späten Endosomen (BOMSEL et al., 1990; CLAGUE et al., 1994; GU und GRUENBERG, 1999). Sie sind relativ große (~0,5 µm) und relativ langlebige (15-30 min) Organellen mit internen Vesikeln. Die Größe dieser Vesikel und ihre Assoziation mit dem Zytoskelett machen sie für Scherkräfte, die bei einer PNS-

Präparation entstehen, anfällig. Sollten sich also endozytierte Marker zum Zeitpunkt der Homogenisierung in Endobrevin/Vti1b-defizienten MEF in endosomalen Carriervesikeln befinden, ist eine Lyse dieser Vesikel wahrscheinlich und das wäre wiederum eine Erklärung für die geringe HRP-Aktivität im Membranpellet dieser Zelllinien.

Mit einem mikroskopischen Assay, bei dem die untersuchten Zellen 20 min mit Avidin-haltigem Medium markiert, anschließend für verschiedene Zeiten ohne Marker inkubiert wurden und nach ihrer Fixierung Avidin- und LAMP1-fluoreszenzmarkiert wurden, konnte gezeigt werden, dass Endobrevin/Vti1b-doppeldefiziente Zellen einen verlangsamten Transport von endozytierten Markern in lysosomale Kompartimente aufweisen. Die meisten Kolokalisationen von Avidin und LAMP1 konnten erst nach 3 Stunden chase beobachtet werden, wohingegen bei Wildtypzellen, sowie bei Vti1b-defizienten Zellen nach einer Stunde chase die meisten Kolokalisationen ausmachbar waren. Dieser Befund ist eine zusätzliche Unterstützung der Vermutung, dass sich endozytiertes Material bei diesen Zelllinien länger als in Wildtypzellen in frühen endosomalen Kompartimenten oder in endosomalen Carriervesikeln befindet. Um im Endosomenfusionsassay markierte, fusionsfähige späte Endosomen von Endobrevin/Vti1b-doppeldefizienten Zellen zu erhalten, empfiehlt es sich, längere chase-Zeiten (3h) zu wählen und die Markierung der Zellen vor der Trypsinierung auf Zellkulturschalen, statt anschließend in Falcon-Tubes, durchzuführen. Vti1a-defiziente Zellen zeigten schon nach einer halben Stunde Kolokalisationen, weswegen bei diesen Zellen für die Präparation von fusionsfähigen späten Endosomen die Markierungszeiten entsprechend angepasst werden sollten.

Fusionsinhibierungsversuche mit NEM zeigten, dass es sich bei den gemessenen HRP-Aktivitäten tatsächlich um SNARE-vermittelte Fusionen handeln muß.

Sowohl frühe als auch späte Endosomen von Vti1b-defizienten MEF konnten fusionieren, obwohl Antikörper gegen Vti1b die Fusion von späten Endosomen in PC12 Zellen zu ca. 70% hemmen (ANTONIN et al., 2000b). Die Quantifizierung dieser Fusionen ist schwierig, aber ein weiterer Hinweis dafür, dass der Verlust von Vti1b kompensiert wird. Vti1b-Defizienz verursacht im Mausmodell nur einen sehr milden Phänotyp. Nur in Hepatozyten von kleinen Vti1b-defizienten Mäusen wurde eine Verlangsamung der Degradierung von Asialofetuin in Lysosomen festgestellt (ATLASHKIN et al., 2003).

Der Transport und der anschließende Abbau von LDL (Low density lipoprotein) in *Vti1b*-defizienten MEF war normal (ATLASHKIN, 2002).

Verschiedene weiterführende Versuche zeigten, dass sich das Fusionsassay nicht für den unmittelbaren Vergleich von Fusionen eignet, die bei Versuchen mit unterschiedlichen PNS-Präparationen gemessen werden können. Der jeweilige Zustand der Zellen vor der Markeraufnahme ist sehr variabel und mitentscheidend für die Mengen von aufgenommenem Marker, sowie für die Fähigkeit der Zellen diesen nach der Endozytose weiterzutransportieren. Außerdem kann trotz optimierter Homogenisierungsbedingungen nicht garantiert werden, dass tatsächlich jeder Schritt der Homogenisierung immer 100%ig gleich abläuft. Deswegen ist ein wichtiges Fazit dieses Kapitels die Empfehlung Experimente so zu planen, dass immer nur eine Präparation von PNS eingesetzt wird.

4.3 Charakterisierung von *Vti1a*- sowie *Vti1b*-Defizienz im Mausmodell

Zur Untersuchung der *Vti1b*-Defizienz im Rahmen dieser Dissertation standen *Vti1b*-defiziente Mäuse und *Vti1b*-defiziente Maus-embryonale Fibroblasten (MEF) zur Verfügung. Die *Vti1b*-defizienten Mäuse sind lebensfähig und fertil. Syntaxin 8, einer der Komplexpartner von *Vti1b*, ist in *Vti1b*-defizienten Geweben reduziert. Ungefähr 20% der defizienten Mäuse waren kleiner. Aus ihnen isolierte Hepatozyten zeigten neben morphologischen Unterschieden, einen verlangsamten Abbau von Asialofetuin in Lysosomen. Zwischen Wildtyp-Mäusen und normal großen *Vti1b*-defizienten Mäusen konnte kein Unterschied in der Degradierung von Asialofetuin festgestellt werden (ATLASHKIN, 2002; ATLASHKIN et al., 2003). Diese phänotypische Divergenz ist durch den genetischen Hintergrund der *Vti1b*-defizienten Mäuse erklärbar. Die benutzten embryonalen Stammzellen stammen von Sv129Ole-Mäusen. Aus diesen hervorgegangene Chimären wurden mit C57BL-Mäusen gekreuzt und daraus resultierende heterozygote Tiere wiederum untereinander, um *Vti1b*-defiziente Tiere zu erhalten. Als Grund für den milden Phänotyp in kleinen *Vti1b*-defizienten Mäusen wird eine Kompensierung durch andere SNAREs wie SNAP29 oder *Vti1a* und Syntaxin 6 bzw. durch einen kompletten anderen Komplex diskutiert.

Aus Kreuzungen von Endobrevin-defizienten Mäusen mit Vti1b-defizienten Tieren wurden Endobrevin/Vti1b-doppeldefiziente Mäuse erhalten, welche ebenfalls Heterogenität in Bezug auf Gewicht und Größe aufweisen. Kleine doppeldefiziente Mäuse zeigten eine veränderte Morphologie des Thymus. Die Mortalität von doppeldefizienten Tieren sowie von Endobrevin-defizienten aber Vti1b-heterozygoten Tieren ist erhöht. Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, dass der Verlust einer dritten Komponente des SNARE-Komplexes schwerer wiegende Folgen hat, als der Verlust von Vti1b und Syntaxin 8. Dass trotzdem doppeldefiziente Tiere überleben und sich fortpflanzen können, lässt wiederum auf kompensatorische Mechanismen schließen.

Zur Untersuchung der Vti1a-Defizienz standen Vti1a-defiziente Mäuse zur Verfügung. Vti1a-defiziente Maus-embryonale Fibroblasten wurden aus 13,5 Tage alten Embryonen gewonnen und durch wiederholtes Passagieren immortalisiert. Die Vti1a-defizienten Mäuse sind lebensfähig und fertil. Mittels Immunoblotting und Immunofluoreszenz konnte kein Vti1a in Geweben und MEF von Vti1a-defizienten Tieren nachgewiesen werden. Bei allen bisher mittels Immunoblottings untersuchten Proteinen konnte keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Wie bei Vti1b-defizienten Mäusen gab es auch bei Vti1a-defizienten Mäusen Tiere, die kleiner als ihre Wurfgeschwister waren. Sie entstammen Verpaarungen, bei denen beide Elternteile heterozygot war. Von 25 aus diesen Verpaarungen geborenen Vti1a-defizienten Mäusen waren 7 kleiner. Diese kleinen Vti1a-defizienten Mäuse starben, bevor sie einen Monat alt waren, weswegen nur mit normalgewichtigen Vti1a-defizienten Mäusen weitergezüchtet werden konnte. Bei Verpaarungen von normalgewichtigen Vti1a-defizienten Mäusen traten keine kleineren Tiere mehr auf. Bei histologischen Untersuchungen der Leber eines kleinen Tiers konnte akkumuliertes Material im Zytoplasma von Hepatozyten festgestellt werden. Wie bei den Vti1b-Mäusen ist bei Vti1a-defizienten Mäusen kein oder nur ein sehr milder Phänotyp zu beobachten. Die Aktivität von vier getesteten löslichen lysosomalem Enzymen war in Geweben von Vti1a-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt. Vti1a ist also kein essentielles Protein in Mäusen und der Schluss liegt nahe, auch für den Verlust von Vti1a kompensierende Mechanismen anzunehmen. Bei der Kompensation der Vti1a-Defizienz wären Vti1b mit oder ohne Syntaxin 8 sowie SNAP29 aufgrund ihrer zellulären Lokalisation die wahrscheinlichsten Kandidaten. SNAP29 kann Syntaxine binden, die sowohl an der Plasmamembran als auch

intrazellulär lokalisiert sind. SNAP23 hingegen soll nur an der Plasmamembran lokalisierte Syntaxine binden (HOHENSTEIN et al., 2001). Eine Kompensation der Vt1a-Defizienz durch SNAP23 wäre also weniger wahrscheinlich als die durch SNAP29. Es konnte zwar keine Erhöhung der Expression von SNAP29 bzw. Vt1b in Vt1a-defizienten Geweben festgestellt werden, aber es wäre möglich, dass endogene Mengen dieser Proteine für eine Kompensation ausreichend sind. Sowohl bei Vt1a- als auch bei Vt1b-Defizienz wäre eine Kompensation durch Membrin (Qb) und mbet1 (Qc) denkbar, aber aufgrund ihrer zellulären Funktion und Lokalisation eher unwahrscheinlich. Diese beiden SNAREs bilden einen Komplex mit sec22b und Syntaxin 5 und werden im ER-Golgi-Transport benötigt (XU et al., 2000). Auch das Qb-SNARE GS28, welches dem Golgi-Apparat zugeordnet wird und möglicherweise im intra-Golgi-Verkehr eine Rolle spielt (HAY, 2001) sowie SNAP23, das an der Plasmamembran lokalisiert ist und für Exozytose benötigt wird (HAY, 2001) wären Kandidaten für eine Kompensation von Vt1a- bzw. Vt1b-Defizienz. Weitere Qb-SNAREs wurden in den Genomprojekten in Säugern nicht identifiziert. Das neuronenspezifische SNAP25 könnte für den Verlust der hirnspezifischen Splicevariante Vt1a- β kompensieren, in anderen Geweben müsste allerdings dann noch ein weiteres Qb-SNARE den Verlust des ubiquitären Vt1a kompensieren.

Kreuzungen von Vt1b-defizienten Mäusen mit Vt1a-defizienten Tieren sind höchstwahrscheinlich letal. Bis jetzt ist kein lebendes Tier geboren worden. Die embryonale Entwicklung ist bis zum Tag vor der Geburt nachgewiesen worden. Die Letalität der Vt1a/Vt1b-Doppeldefizienz unterstützt zusammen mit der Tatsache, dass Vt1a und Vt1b zu ca. 30 % identisch in ihren Aminosäuresequenzen sind und eine überlappende subzelluläre Verteilung aufweisen, die Vermutung einer gegenseitigen Kompensierung bei den jeweiligen Knockouts. Aus 13,5 Tage alten Embryonen sind Maus-embryonale Fibroblasten gewonnen worden, die auch für Versuche dieser Dissertation benutzt wurden. Es ist überraschend, dass die Embryonen und die MEF überhaupt überleben. In Hefe ist Vt1p essentiell (FISCHER von MOLLARD et al., 1997). Es ist anzunehmen, dass auch bei Vt1a/Vt1b-doppeldefizienten Mäusen ein kompensatorischer Mechanismus existiert, der den Embryonen ihre Entwicklung und den MEF ihr Überleben ermöglicht.

4.3.1 Proteinlevel von Syntaxin 8 in Vti1b-defizienten Mäusen sowie von Syntaxin 6 in Vti1a-defizienten Mäusen

In Geweben von Vti1b-defizienten Mäusen ist mittels Immunoblottings eine Reduzierung der Proteinmengen von Syntaxin 8 festgestellt worden, die nicht einer reduzierten Syntheserate zugeordnet werden konnte. Proteinmengen der beiden weiteren Komplexpartner Syntaxin 7 und Endobrevin waren nicht beeinträchtigt. mRNA-Level von Syntaxin 8 waren in Vti1b-defizienten Mäusen mit dem im Wildtyp vergleichbar (ATLASHKIN et al., 2003). Durch Experimente mit Proteaseinhibitoren konnte hier herausgefunden werden, dass Syntaxin 8 in Vti1b-defizienten Zellen zumindest teilweise in Lysosomen degradiert wird. Der proteasomale Inhibitor Lactacystin hatte keinen Einfluß auf die Stabilisierung von Syntaxin 8, wohingegen mit Leupeptin, einem Inhibitor der lysosomalen Proteindegradierung, nach 16 Stunden Inkubation ein Anstieg der Proteinmengen von Syntaxin 8 beobachtet werden konnte. Ganz ausgeschlossen ist eine proteasomale Degradierung von Syntaxin 8 allerdings nicht, da unter den Versuchsbedingungen eventuell Apoptose induziert wurde. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass Vti1b für die Stabilität von Syntaxin 8 benötigt wird.

Syntaxin 8 und Vti1b sind Qc- bzw Qb-SNARE eines SNARE-Komplexes, der an der Fusion von späten Endosomen und Lysosomen beteiligt ist (ANTONIN et al., 2000b). Ihre subzelluläre Lokalisation ist ähnlich. Syntaxin 8 ist auf der äußeren Membran von multivesikulären Körperchen (multivesicular bodies, MVB) lokalisiert, Vti1b konnte auf frühen Endosomen, MVBs, dem TGN und Lysosomen gefunden werden (KREYKENBOHM et al., 2002). Das Fehlen von Vti1b könnte zu einer fehlerhaften Lokalisierung von Syntaxin 8 auf Membranen der internen Vesikel der MVB führen und somit zur Degradierung des SNAREs in Lysosomen. Es ist auch denkbar, dass Syntaxin 8 durch das Fehlen von Vti1b nicht korrekt gefaltet werden kann und in Folge dessen instabil ist, was ebenfalls in Degradierung resultiert. Die beiden an der Komplexbildung beteiligten Helices von Syntaxin 8 und Vti1b sind homolog zu den Helices von SNAP25 des neuronalen SNARE-Komplexes. In einer in vitro Studie, bei der promiske SNARE-Komplexe aus Helices des neuronalen und späten endosomalen Komplexes auf ihre Stabilität getestet wurden, resultierte nur bei Ersatz von Vti1b und Syntaxin 8, nicht jedoch bei Ersatz von nur einem der beiden SNAREs ein stabiler Komplex (ANTONIN et

al., 2000c). Diese Ergebnisse sind eventuell ein Hinweis darauf, dass Qb- und Qc-Helices entweder von einem einzigen Protein wie beispielsweise SNAP25 stammen oder von zwei Proteinen gestellt werden, die funktionell eng miteinander verknüpft sind.

Bei der Analyse von Vt1a-defizienten Geweben mittels Immunoblottings konnten bei den untersuchten Proteinen keine Änderungen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Dies war im Falle von Syntaxin 6 etwas überraschend, denn Vt1a und Syntaxin 6 sind die Homologe für SNAP-25 im neuronalen SNARE-Komplex, genau wie Vt1b und Syntaxin 8. Da die Menge von Syntaxin 8 in Vt1b-defizienten Zellen und Geweben stark reduziert ist, wurde für Syntaxin 6 in Vt1a-defizienten Zellen und Geweben ein ähnlicher Effekt erwartet. Das Vorhandensein von Wildtyp-ähnlichen Mengen von Syntaxin 6 lässt zunächst vermuten, dass das Protein trotz fehlendem Vt1a korrekt gefaltet vorliegt. Syntaxin 8 ist mit multivesikulären Körperchen assoziiert, welche mit Lysosomen fusionieren, wonach anschließend deren Inhalt degradiert wird. Syntaxin 6 ist auf Membranen des TGN lokalisiert (STEEGMAIER et al., 1999; BOCK et al., 1997) und wird mit der Fusion von frühen Endosomen sowie der homotypischen Fusion von sekretorischen Vesikeln in Verbindung gebracht (MILLS et al., 2001; WENDLER et al., 2001). Es ist also aufgrund dieser Unterschiede in Lokalisation und Funktion der beiden Qc-SNAREs denkbar, dass unbenötigtes Syntaxin 6, im Gegensatz zu Syntaxin 8, nur sehr selten in die Nähe oder sogar in Lysosomen gelangt und somit auch nicht degradiert wird. Sollten Qb- und Qc-Helices tatsächlich so eng miteinander verknüpft sein, dass eine Helix für die Stabilität der anderen benötigt wird, wäre eine Beteiligung von Syntaxin 6 an einem anderen SNARE-Komplex, bei dem Vt1a keine Rolle spielt, denkbar und somit auch eine Erklärung für die unbeeinflussten Proteinmengen von Syntaxin 6.

4.3.2 Umverteilung von Vt1b in Vt1a-defizienten Zellen

Um zu überprüfen, welchen Effekt die Defizienz von Vt1a auf die subzelluläre Verteilung von Vt1b hat, wurden von Wildtypzellen und Vt1a-defizienten MEF Doppelimmunofluoreszenzen mit LAMP1 und Vt1b angefertigt. Zu beobachten war eine Veränderung des typischen hauptsächlich perinukleären sowie teilweise peripher vesikulären Verteilungsmusters von Vt1b zu einer weniger perinukleären, in peripheren Vesikeln intensiveren Färbung. Kollokalisierungen von Vt1b mit LAMP1 scheinen in

Vt1a-defizienten Zellen zuzunehmen. Allerdings kann das auch ein rein optischer Eindruck sein, hervorgerufen durch die Tatsache, dass die perinukleäre Färbung von Vt1b viel weniger intensiv ist. Vt1b ist ein Kandidat für die Kompensierung der Vt1a-Defizienz und eine Umverteilung von Vt1b in Vt1a-defizienten Zellen ist kein Beweis, aber vielleicht ein Hinweis darauf, dass es Vt1a in der Fusion von frühen Endosomen Vt1a ersetzen könnte. Andererseits wäre auch eine Fehlsortierung von Vt1b während des Transports vom TGN zum Ort der Funktionsausübung, bedingt durch einen nicht mehr stattfindenden Fusionsschritt auf diesem Weg, eine Erklärung. Sollte bei Vt1a-defizienten Zellen ein Defekt im retrograden Transport von Vt1b vorliegen wäre auch das ein möglicher Grund für eine Umverteilung von Vt1b. Antikörper gegen Vt1a verhinderten in einer Studie den retrograden Transport der β -Kette von Shigatoxin von frühen Endosomen ins TGN (MALLARD et al., 2002). Somit ist eine Beteiligung von Vt1a diesem retrograden Transportweg nachgewiesen, was die Vermutung eines Defekts im Transport von frühen Endosomen zum TGN in Vt1a-defizienten Zellen untermauert. Eine genauere Analyse könnte mittels quantitativer Immunoelektronenmikroskopie mit Anti-Vt1b stattfinden, was aber sehr aufwendig ist.

4.3.3 RNAi von SNAP29 in Vt1b-defizienten Zellen

SNAP29 ist ein lösliches, hauptsächlich im Cytoplasma zu findendes SNARE-Protein, über dessen Funktion im intrazellulären Membrantransport und seine möglichen SNARE-Partner noch nichts bekannt ist. Seine beiden Helices (Qb und Qc) könnten für den Verlust von Vt1b (Qb) und Syntaxin 8 (Qc) kompensieren. Es wurden daher zwei siRNA-Konstrukte generiert (namentlich a und b), die für die spezifische Degradierung von SNAP29 mRNA in Wildtypzellen und Vt1b-defizienten Zellen sorgen sollten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zielsequenz von SNAP29 möglichst wenig Übereinstimmungen mit Sequenzen von anderen Maus-mRNA besitzt und in der Zielregion keine Sekundärstruktur der mRNA, wie z.B. Haarnadelschleifen, zu erwarten sind. Da sowohl die Vt1b-defizienten Zellen als auch der siRNA-Vektor Neomycinresistenz besitzen, wurde zusätzlich ein Vektor mit Hygromycinresistenz cotransfiziert und mit Hygromycin selektiert. Zu Kontrollzwecken wurden beide Zelllinien nur mit letzterem Vektor transfiziert. Von insgesamt 48 Klonen der

kotransfizierten Wildtypzellen zeigte nur ein Klon mit Konstrukt a eine Reduzierung von SNAP29 auf 23% bzw. 56% der Menge, die in Wildtypzellen detektiert werden konnte. Diese Werte wurden durch Quantifizierung von zweimal angefertigten Immunoblots ermittelt. Von den kotransfizierten Vti1b-defizienten Zellen überlebten nur zwei Klone die Transfektion, diese vermehrten sich aber nicht weiter, nachdem sie gepickt wurden und starben ab. Es ist möglich, dass die Zellen aufgrund von RNA-Interferenz abstarben. In dem Fall wäre für Vti1b-defiziente Zellen SNAP29 essentiell. Diese Möglichkeit ist aber als gering einzustufen, da die transfizierten Wildtypzellen nur bei einem Klon einen Effekt des transfizierten Konstrukts aufwiesen. Die ermittelten Werte für die Reduktion von SNAP29 sind ein Hinweis darauf, dass die verwendeten Konstrukte a und besonders b nicht geeignet sind, RNAi hervorzurufen und es sinnvoll wäre, weitere Sequenzen zu testen. Da auch von den nur mit Hygromycinresistenzvektor transfizierten Vti1b-defizienten Zellen kein Klon für Analysen gewonnen werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass die Vti1b-defiziente Zelllinie E5 nicht transfizierbar ist. Es würde sich eventuell lohnen, die Vti1b-defiziente Zelllinie AB7 nach ihrer Immortalisierung für weitere RNAi-Experimente zu nutzen, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob SNAP29 den Verlust von Vti1b und Syntaxin 8 kompensieren kann.

4.3.4 Analyse von Maus-embryonalen Fibroblasten verschiedenen Genotyps mit Immunofluoreszenz und Internalisierungsassays

4.3.4.1 Erhöhung der Transporteffizienz von endozytierten Markern in Vti1a-defizienten MEF

Sowohl bei der Flüssigphase-Endozytose von Avidin, als auch bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose von fluoreszent markiertem LDL (Low density Lipoprotein) konnte in Vti1a-defizienten Zellen eine Beschleunigung des Transports der endozytierten Marker innerhalb des endosomalen Membransystems beobachtet werden. Die Endozytose von Avidin hat gezeigt, dass endozytiertes Material späte endosomale und lysosomale Kompartimente von Vti1a-defizienten Zellen schneller erreichte als in Wildtyp-Zellen. Kolokalisationen von Avidin mit LAMP1, einem Marker für späte Endosomen und

Lysosomen traten bei Vt1a-defizienten Zellen schon nach 30 min chase auf, bei Wildtypzellen erst nach einer Stunde. Bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose von LDL konnten in Vt1a-defizienten Zellen früher als in Wildtypzellen grössere lysosomale Strukturen beobachtet werden. Auch die Degradierung von LDL, die in einer Verringerung der Signalintensität reduziert, war in Vt1a-defizienten beschleunigt. Allerdings konnte bei der Endozytose und Transport von FITC-Dextran in Vt1a-defizienten Zellen kein Unterschied zu Wildtypzellen festgestellt werden. Die Bedeutung dieser Ergebnisse ist noch unklar. Fest steht, dass Vt1a-defiziente Zellen in ihrer Fähigkeit extrazelluläres Material zu endozytieren, nicht beeinträchtigt sind. Rein hypothetisch wäre bei einer Kompensation des Verlustes von Vt1a durch Vt1b eine fehlgeleitete Verschmelzung von endozytierten Vesikeln mit späten Endosomen oder Lysosomen denkbar, die mit der Affinität von Vt1b zu Komponenten des späten endosomalen SNARE-Komplexes begründet werden kann. Ein Komplex, in dem Vt1b für Vt1a ersetzt wird, könnte zusätzlich noch Syntaxin 8 anstelle von Syntaxin 6 enthalten. Eine enge funktionelle Verknüpfung von Vt1b mit Syntaxin 8 ist durch den teilweisen Verlust von Syntaxin 8 bei Vt1b-Defizienz nachgewiesen worden. Da Syntaxin 6 durch den Verlust von Vt1a nicht beeinträchtigt ist, wäre auch eine Kombination von Vt1b, Syntaxin 6, Syntaxin 16 und VAMP4 denkbar. Darüber ob Syntaxin 16 oder VAMP4 ebenfalls durch andere SNAREs ersetzt werden können, ist nichts bekannt. In vitro-Studien haben gezeigt, dass SNAREs des neuronalen Komplexes mit SNAREs des späten endosomalen Komplexes ersetzt werden können, solange darauf geachtet wird, dass die R-, Qa-, Qb-, Qc-Regel eingehalten wird (ANTONIN et al., 2000b). Sollte Vt1a-Defizienz durch Vt1b kompensiert werden können, wäre das ein Hinweis darauf, dass auch in vivo promiske SNARE-Komplexe entstehen können. Für eine Kompensation der Vt1a-Defizienz mit Vt1b sprechen die Umverteilung von Vt1b in Vt1a-defizienten Zellen und die Tatsache, dass Vt1a/Vt1b-doppeldefiziente Mäuse nicht lebensfähig sind. Bis heute ist über die genaue Verteilung von endosomalen SNAREs auf Donor- und Akzeptor-Membranen nichts bekannt. Vom neuronalen Komplex weiß man, dass SNAP25 und Syntaxin 1 in der Plasmamembran lokalisiert sind, während Synaptobrevin den synaptischen Vesikeln zugeordnet wird. Nimmt man nun an, dass Vt1b zusammen mit Syntaxin 8 und Syntaxin 16 gemeinsam auf endozytierten Vesikeln zu finden sind, ist es leicht vorzustellen, dass diese Kombination

von SNAREs einen Komplex mit Endobrevin bilden kann, dass frühen aber auch späten Endosomen zugeordnet worden ist (ANTONIN et al., 2000b) und somit endozytiertes Material teilweise gleich nach der Endozytose in späte Kompartimente, anstelle von frühen Endosomen, gelangen könnte.

4.3.4.2 Retardierung des Transports von endozytierten Markern in Endobrevin/Vti1b-doppeldefizienten MEF

Endobrevin/Vti1b-doppeldefiziente Zellen zeigen sowohl bei der Endozytose von LDL, sowie von Avidin eine Verlangsamung des Transports von endozytierten Markern in späte endosomale und lysosomale Kompartimente. Die Verteilung von LDL in Endobrevin/Vti1b-doppeldefizienten MEF ähnelt drei Stunden nach Beginn der Markeraufnahme immer noch Verteilungsmustern von frühen Stadien. Eine Akkumulation von LDL in grösseren Strukturen, die späten Endosomen oder Lysosomen entsprechen könnten und die in intensiverer Fluoreszenz resultieren würde, konnte nicht beobachtet werden. Der Defekt war in Endobrevin/Vti1b-doppeldefizienten Zellen stärker als in Zellen, denen nur Endobrevin fehlte. Endozytiertes Avidin kolokalisiert ebenfalls erst drei Stunden nach Markeraufnahme mit dem späten endosomalen und lysosomalen Marker LAMP1. In Wildtypzellen konnte diese Kolokalisation schon nach einer Stunde chase beobachtet werden. Diese Befunde sind ein Hinweis darauf, dass das Fehlen einer dritten Komponente des späten endosomalen SNARE-Komplexes für den intrazellulären Transport nicht mehr so leicht zu kompensieren ist und spricht gegen die Vermutung, dass der Verlust von Vti1b und Syntaxin 8 in Vti1b-defizienten Mäusen von einem komplett anderen Komplex kompensiert wird. Diese Vermutung wird durch erste Befunde der Endobrevin/Vti1b-doppeldefizienten Mäuse unterstützt, die eine erhöhte Mortalität und Veränderungen der Thymusmorphologie zeigen (KANVAR, 2004). Zusammen mit den gemessenen niedrigen HRP-Aktivitäten der postnukleären Überstände von Präparationen später Endosomen von Endobrevin/Vti1b-defizienten, die auf eine Überhomogenisierung hindeuten, lässt sich spekulieren, dass endozytiertes Material in die relativ grossen, mit dem Zytoskelett assoziierten endosomalen Carriervesikel gelangt, diese aber weniger und langsamer als in Wildtypzellen mit späten Endosomen verschmelzen können.

4.3.4.3 Umverteilung von MPR46 in Vti1a/Vti1b-doppeldefizienten MEF

Durch Immunofluoreszenz konnte eine im Vergleich zu Wildtypzellen veränderte subzelluläre Verteilung von MPR46 in Vti1a/Vti1b-doppeldefizienten Zellen beobachtet werden. Die Verteilung ist mehr dispers über die gesamte Zelle verteilt und das lässt vermuten, dass die Lokalisation von MPR46 durch die Doppeldefizienz von Vti1a und Vti1b beeinträchtigt wird. In $\mu 1$ -defizienten Zellen ist ebenfalls ein verändertes Verteilungsmuster von MPR46 festgestellt worden, das auf einen Defekt im retrograden Transport des MPR46 vom frühen Endosom zum TGN zurückgeführt wurde (MEYER et al., 2000). Es wäre denkbar, dass das Recycling von MPR46 in Abwesenheit von Vti1a und Vti1b verhindert oder zumindest behindert wird, was zu einer vermehrten Anwesenheit von MPR46 auf endosomalen Strukturen führen würde. Die Umverteilung von Vti1b in Vti1a-defizienten Zellen könnte ebenfalls auf einen eventuell milderen Defekt im retrograden Transport zurückzuführen sein. Allerdings ist die Verteilung des MPR46 in Vti1a-defizienten Zellen nicht beeinträchtigt. Eine Studie in der Vti1a, Syntaxin 6 und Syntaxin 16 mit dem retrograden Transport der β -Kette des Shigatoxins von frühen Endosomen zum TGN in Zusammenhang gebracht wurden (MALLARD et al., 2002), ist eine zusätzliche Unterstützung für die hier angestellte Vermutung. Zur weiteren Klärung dieses interessanten Aspekts könnten Doppelimmunfluoreszenzen mit MPR46 und Markern für frühe endosomale Kompartimente beitragen.

5 Zusammenfassung

SNARE-Proteine spielen als Vermittler der Membranfusion eine wichtige Rolle im intrazellulären Membrantransport. Diese Arbeit wurde angefertigt um mehr über den Mechanismus des Transports innerhalb der Zelle herauszufinden und Proteine zu charakterisieren, die im endosomalen und lysosomalen Transport eine Rolle spielen. Dabei wurden die endosomalen Qb-SNARE-Proteine Vt1a und Vt1b näher untersucht.

Mittels Immunopräzipitationen konnte nachgewiesen werden, dass Vt1a zusammen mit Syntaxin 6 (Qc), Syntaxin16 (Qa) und VAMP4 (R) einen Komplex bildet.

Vt1a-defiziente Mäuse sind lebensfähig und fertil. Untersuchungen der Aktivitäten von lysosomalen Enzymen in Geweben von Vt1a-defizienten Tieren ergaben normale Werte, was auf eine Kompensation der Vt1a-Defizienz deutet. Proteinmengen von untersuchten SNAREs waren in Vt1a-defizienten Geweben nicht beeinträchtigt, was jedoch eine mögliche Kompensierung der Vt1a-Defizienz durch diese Proteine nicht ausschließen kann.

Außerdem wurde gezeigt, dass Syntaxin 8 (Qc) in Vt1b-defizienten Zellen in Lysosomen degradiert wird. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Vt1b entweder für die Stabilität des Syntaxin 8 benötigt wird oder eine Fehlsortierung in das Lysosom verhindert. Die Menge des Qc-SNAREs Syntaxin 6 ist in Vt1a-defizienten Zellen nicht beeinträchtigt, was darauf hinweist, dass Syntaxin 6 eventuell noch eine andere Funktion ausübt. Auch die von Lysosomen weiter entfernte Lokalisation von Syntaxin 6 wäre eine Erklärung dafür, dass bei Fehlen des Qb-SNAREs Vt1a die Stabilität des korrespondierenden Qc-SNAREs Syntaxin 6 nicht beeinträchtigt ist.

Ein Endosomenfusionsassay für Maus-embryonale Fibroblasten wurde etabliert. Die Fusionsfähigkeit von späten Endosomen von Vt1b-defizienten Zellen ist ein weiterer Hinweis darauf, dass andere SNAREs das Fehlen von Vt1b kompensieren.

Internalisierungsassays haben gezeigt, dass der Transport von pinozytierten oder Rezeptor-vermittelt endozytierten Markern in lysosomale Kompartimente in Vt1a-defizienten Zellen beschleunigt und in Endobrevin/Vt1b-doppelfizienten Zellen verlangsamt ist. Die Beschleunigung des Transports in Vt1a-defizienten Zellen sowie die beobachtete Umverteilung von Vt1b in Vt1a-defizienten Zellen spricht für eine

Kompensierung der Vti1a-Defizienz mit Vti1b. Auch ein Defekt im retrograden Transport von den frühen Endosomen zum TGN könnte der Grund für die Umverteilung sein. Der langsamere Transport von endozytierten Markern in Endobrevin/Vti1b-doppeldefizienten Zellen spricht gegen eine Kompensation der Vti1b-Defizienz durch einen komplett anderen SNARE-Komplex.

Eine Umverteilung von MPR46 in Vti1a/Vti1b-doppeldefizienten Zellen konnte beobachtet werden und ist vielleicht mit einem Defekt im retrograden Transport vom frühen Endosom zum TGN verknüpft.

6 Literaturverzeichnis

- Al-Kaissi, E. and Mostratos, A., 1983: Assessment of substrates for horseradish peroxidase in enzyme immunoassay. *J. Immunol. Methods* 58: 127-132
- Anderson, R.G., Goldstein, J.L. and Brown, M.S., 1976: Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. *P.N.A.S. USA* 73(7): 2434-2438
- Antonin, W., Riedel, D., and Fischer von Mollard, G., 2000a: The SNARE Vti1a- β is localized to small synaptic vesicles and participates in a novel SNARE complex. *J. Neurosci.* 20: 5724-5732
- Antonin, W., Holroyd, C., Tikkanen, R., Hönig, S., and Jahn, R., 2000b: The R-SNARE endobrevin/VAMP-8 mediates homotypic fusion of early and late endosomes. *Mol. Biol. Cell* 11: 3289-3298
- Antonin, W., Holroyd, C., Fasshauer, D., Pabst, S., Fischer von Mollard, G., and Jahn, R., 2000c: A SNARE complex mediating fusion of late endosomes defines conserved properties of SNARE structure and function. *EMBO J.* 19: 6453-6464
- Antonin, W., Fasshauer, D., Becker, S., Jahn, R. and Schneider, T.R., 2002: Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat. Struc. Biol.* 9: 107-111
- Atlashkin, V., 2002: Characterisation of Vti1b and Vti1a proteins and generation of knock-out mice, Dissertation, Universität Göttingen

- Atlashkin, V., Kreykenbohm, V., Eskelinen, E.L., Wenzel, D., Fayyazi, A. and Fischer von Mollard, G., 2003: Deletion of the SNARE *vti1b* in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin 8. *Mol. Cell. Biol.* 23: 5198-5207
- Binz, T., Blasi, J., Yamasaki, S., Baumeister, A., Link, E., Südhof, T. C., Jahn, R., and Niemann, H., 1994: Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 269: 1617-1620
- Birnboim, H.C. and Doly J., 1979: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523
- Blasi, J., Chapman, E. R., Link, E., Binz, T., Yamasaki, S., de Camilli, P., Südhof, T. C., Niemann, H., and Jahn, R., 1993a: Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 365: 160-163
- Blasi, J., Chapman, E. R., Yamasaki, S., Binz, T., Niemann, H., and Jahn, R., 1993b: Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J.* 12: 4821-4828
- Bock, J.B., Klumpermann, J., Davanger, S., and Scheller, R.H., 1997: Syntaxin 6 functions in trans-Golgi network vesicle trafficking. *Mol. Biol. Cell* 8: 1261-1271
- Bomsel, M., Parton, R., Kuznetsov, S.A., Schroer, T.A. and Gruenberg, J., 1990: Microtubule- and motor-dependent fusion in vitro between apical and basolateral endocytic vesicles from MDCK cells. *Cell* 62: 719-731
- Bradford, M.M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254

- Brickner, J., Blanchette, J., Sipos, G. and Fuller, R., 2001: The Tlg SNARE complex is required for TGN homotypic fusion. *J. Cell Biol.* 155: 969
- Brown, M.S., Anderson, R.G., Basu, S.K. and Goldstein, J.L., 1982: Recycling of cell-surface receptors: observations from the LDL receptor system. *Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology* 46 Pt 2: 713-721
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R., 2002: A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553
- Cao, X., Ballew, N., and Barlowe, C., 1998: Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *EMBO J.* 17: 2156-2165
- Chidambaram, S., Müllers, N., Wiederhold, K., Haucke, V. and Fischer von Mollard, G. 2004: Specific interaction between SNAREs and epsin N-terminal homology (ENTH) domains of epsin-related proteins in trans-Golgi network to endosome transport. *J. Biol. Chem.* 279(6): 4175-9
- Clague, M.J., Urbe, S., Aniento, F. and Gruenberg, J., 1994: Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J. Biol. Chem.* 269: 21-24
- Cohen, S.N., Chang, A.C. and Hsu, L., 1972: Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69(8): 2110-2114
- Crick, F. H. C., 1953: The packing of α -helices: simple coiled coils. *Acta Crystallogr.* 6: 689-697
- de Chastellier, C., Ryter, A. and Thilo, L., 1983: Membrane shuttle between plasma membrane, phagosomes, and pinosomes in *Dictyostelium discoideum* amoeboid cells. *Eur. J. Cell Biol.* 30(2): 233-243

- Dunn, W.A. and Hubbard, A.L., 1984: Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by hepatocytes in the perfused rat liver: ligand and receptor dynamics. *J. Cell Biol.* 98(6): 2148-2159
- Elbashir, S.M., Horborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., 2001: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498
- Fasshauer, D., Otto, H., Eliason, W. K., Jahn, R., and Brünger, A.T., 1997a: Structural changes are associated with soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *J. Biol. Chem.* 272: 28036-28041
- Fasshauer, D., Bruns, D., Shen, B., Jahn, R., and Brünger, A. T., 1997b: A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25. *J. Biol. Chem.* 272: 4582-4590
- Fasshauer, D., Antonin, W., Margittai, M., Pabst, S., and Jahn, R., 1998: Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15781-15786
- Fasshauer, D., Antonin, W., Margittai, M., Pabst, S., and Jahn, R., 1999: Mixed and non-cognate SNARE complexes – characterization of assembly and biophysical properties. *J. Biol. Chem.* 274: 15440-15446
- Fischer von Mollard, G., Nothwehr, S. F., and Stevens, T.H., 1997: The yeast v-SNARE Vti1p mediates two vesicle transport pathways through interactions with the t-SNAREs Sed5p and Pep12p. *J. Cell Biol.* 137: 1511-1524

- Fischer von Mollard, G. and Stevens., T.H., 1998: A human homolog can functionally replace the yeast vesicle-associated SNARE Vti1p in two vesicle transport pathways. *J. Biol. Chem.* 273(5): 2624-30.
- Fischer von Mollard, G., and Stevens, T. H., 1999: The *Saccharomyces cerevisiae* v-SNARE Vti1p is required for multiple membrane transport pathways to the vacuole. *Mol. Biol. Cell* 10: 1719-1732
- 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: 16591-16598
- Gorvel. J.P., Chavrier, P., Zerial, M. and Gruenberg, J., 1991: Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 64: 915-925
- Govindan, B., Bowser, R. and Novick, P., 1995: The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *J. Cell Biol.* 128: 1055-1068
- Gruenberg, J., Gorvel, J.P., Emans, N. and Walter, C., 1991: Subcellular fractionation of endosomes and cell-free analysis of endosomal vesicle fusion. In Gruenberg, J., Hoflack, B. and Wandinger-Ness, A. (eds.), *Course Manual of the EMBO Practical Course: Subcellular Fractionation of Transport Vesicles*. EMBL Heidelberg, pp. 1-36
- Gu, F. and Gruenberg, J., 1999: Biogenesis of transport intermediates in the endocytic pathway. *FEBS Lett.* 452: 61-66
- Hanson, P. I., Otto, H., Barton, N., and Jahn, R., 1995: The *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein and α -SNAP induce a conformational change in syntaxin. *J. Biol. Chem.* 270: 16955-16961
- Hay, J.C., 2000: SNARE complex structure and function. *Exp. Cell Res.* 271(1): 10-21

- Hayashi, T., McMahon, H. T., Yamasaki, S., Binz, T., and Hata, Y., 1994: Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. EMBO J. 13: 5051-5061
- Hayashi, T., Yamasaki, S., Nauenburg, S., Binz, T., and Niemann, H., 1995: Disassembly of the reconstituted synaptic vesicle membrane fusion complex *in vitro*. EMBO J. 14: 2317-2325
- Hess, D.T., Slater, T. M., Wilson, M. C., and Skene, J. H., 1992: The 25 kDa synaptosomal-associated protein SNAP-25 is the major methionine-rich polypeptide in rapid axonal transport and a major substrate for palmitoylation in adult CNS. J. Neurosci. 12: 4634-4641
- Hille-Rehfeld, A., 1995: Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. Biochim. Biophys. Acta 1241: 177-194
- Hirst, J. and Robinson, M.S., 1998: Clathrin and adaptors. Biophys. Acta 1404: 173-193
- Hohenstein, A.C. and Roche, P.A., 2001: SNAP-29 is a promiscuous syntaxin-binding SNARE. Biochem. Biophys. Res. Commun. 285(2): 167-171
- Holroyd, C., 2001: In vitro-Charakterisierung der homotypischen Fusion von early und late endosomes aus PC12-Zellen. Dissertation, Universität Göttingen
- Jahn, R., and Südhof, T. C., 1999: Membrane fusion and exocytosis. Annu. Rev. Biochem. 68: 863-911
- Jahn, R., Lang, T., and Südhof, T.C., 2003: Membrane fusion. Cell, 112: 519-533

- Kanwar, N., 2004: Analysis of mice deficient in late endosomal SNARE proteins vti1b and VAMP8/Endobrevin, Master's Thesis, Universität Göttingen
- Klein, G. and Satre, M., 1986: Kinetics of fluid-phase pinocytosis in *Dictyostelium discoideum* amoebae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138(3): 1146-1152
- Kreykenbohm, V., 2001: Vti1a – Lokalisation und SNARE-Partner, Diplomarbeit, Universität Göttingen
- Kreykenbohm, V., Wenzel, D., Antonin, W., Atlachkine, V., Fischer von Mollard, G., 2002: The SNAREs vti1a and vti1b have distinct localization and SNARE complex partners. *Eur. J. Cell. Biol.*, 81 : 273-280
- Laemmli, U. K., 1970: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lazar, T., Götte, M., and Gallwitz, D., 1997: Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell? *Trends Biochem. Sci.* 22: 468-473
- Lehrbach, H., and Frischauf, A. M., 1982: EMBL. – Lab. Manual, Heidelberg
- Link, E., Edelman, L., Chou, J. H., Binz, T., Eisel, U., Baumert, M., Südhof T. C., Niemann, H., and Jahn, R., 1992: Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 1017-1023
- Link, E., McMahon, H., Fischer von Mollard, G., Yamasaki, S., Niemann, H., Südhof, T. C., and Jahn, R., 1993: Cleavage of cellubrevin by tetanus toxins does not affect fusion of early endosomes. *J. Biol. Chem.* 268: 18423-18426

- Lupashin, V. V., Pokrovskaya, I. D., McNew, J. A., and Waters, M. G., 1997: Characterization of a novel yeast SNARE protein implicated in Golgi retrograde traffic. *Mol. Biol. Cell* 8: 2659-2676
- Mallard, F., Tang, B.L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue, X., Antony, C., Hong, W., Goud, B. and Johannes, L., 2002: Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J. Cell. Biol.* 156: 653-664
- Mayer, A., and Wickner, W., 1997: Docking of yeast vacuoles is catalyzed by the Ras-like GTPase Ypt7p after symmetric priming by Sec18p (NSF). *J. Cell Biol.* 136: 307-317
- McMahon, H. T., and Südhof, T. C., 1995: Synaptic core complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP25 forms high affinity alpha-SNAP binding site. *J. Biol. Chem.* 270: 2213-2217
- McManus, M.T. and Sharp, P.A., 2002: Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature Rev. Genet* 3: 737-747
- Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E.L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K. and Schu P., 2000: μ 1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *The EMBO Journal* 19: 2193-2203
- Mills, I.G., Urbe, S. and Clague, M.J., 2001: Relationships between EEA1 binding partners and their role in endosome fusion. *J. Cell Sci.* 114: 1959-1965
- Montecucco, C., and Schiavo, G., 1995: Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q. Rev. Biophys.* 28: 423-472
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A., 1987: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350

- Mullock, B. M., Smith, S. W., Ihrke, G., Bright, N. A., Lindsay, M., Parkinson, E. J., Brooks, D. A., Parton, R. G., James, D. E., Luzio, J. P., and Piper, R.C., 2000: Syntaxin 7 is localized to late endosome compartments, associates with VAMP 8, and is required for late endosome-lysosome fusion. *Mol. Biol. Cell* 11: 3137-3153
- Niemann, H., Blasi, J., and Jahn, R., 1994: Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol.* 4: 179-183
- Peden, A., Park, G., and Scheller, R. 2001: The Di-leucine motif of vesicle-associated membrane protein 4 is required for its localization and AP-1 binding. *J. Biol. Chem.* 276(52): 49183-7
- Pelham, H.R., 1999: SNAREs and the secretory pathway – lessons from yeast. *Exp. Cell Res.* 247: 1-8
- Pellegrini, L. L., O'Connor, V., Lottspeich, F., and Betz, H., 1995: Clostridial neurotoxins compromise the stability of a low energy SNARE complex mediating NSF activation of synaptic vesicle fusion. *EMBO J.* 14: 4705-4713
- Peters, P., and Mayer, A., 1998: Ca²⁺/calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion. *Nature* 396: 575-580
- Peters, C., Bayer, M.J., Bühler, S., Andersen, J.S., Mann, M. and Mayer, A., 2001: Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Natur* 409: 581-588
- Prekeris, R., Klumpermann, J., Chen, Y.A. and Scheller, R.H., 1998: Syntaxin 13 mediates cycling of plasma membrane proteins via tubulovesicular recycling endosomes. *J. Cell Biol.* 143: 957-971

- Prekeris, R., Yang, B., Oorschot, V., Klumperman, J. and Scheller, R.H., 1999: Differential roles of syntaxin 7 and syntaxin 8 in endosomal trafficking. *Mol. Biol. Cell* 10: 3891-3908
- Pryor, P.R., Mullock, B.M., Bright, N.A., Lindsay, M.R., Gray, S.R., Richardson, S.C.W., Stewart, A., James, D. E., Piper, R.C. and Luzio, J.P., 2004: Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events. *EMBO Rep.* 5: 590-595
- Rice, L. M., Brennwald, P., and Brünger, A.T., 1997: A formation of a yeast SNARE complex is accompanied by significant structural changes. *FEBS Lett.* 415: 49-55
- Rothman, J. E., 1994: Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372: 55-63
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., 1989: *Molecular cloning: a laboratory manual* (second edition). Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A., 1977: DNA-sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- Schiavo, G., Poulain, B., Rossetto, O., Benfenati, F., Tauc, L., and Montecucco, C., 1992: Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc. *EMBO J.* 11: 3577-3583
- Schiavo, G., Malizio, C., Trimble, W. S., de Laureto, P. P., Milan, G., Sugiyama, H., Johnson, E. A., and Montecucco, C., 1994: Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single Ala-Ala peptide bond. *J. Biol. Chem.* 269: 213-216
- Simonsen, A., Bremnes, B., Ronning, E., Aasland, R. and Stenmark, H., 1998: Syntaxin-16, a putative Golgi-t-SNARE. *Eur. J. Cell Biol.* 75, 223-231

- Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., and Rothman, J. E., 1993: A protein assembly-disassembly pathway *in vitro* that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation and fusion. *Cell* 75: 409-418
- Stegmaier, M., Klumperman, J., Foletti, D. L., Yoo, J.-S., and Scheller, R. H., 1999: Vesicle-associated membrane protein 4 is implicated in *trans*-Golgi network vesicle trafficking. *Mol. Biol. Cell* 10: 1957-1972
- Südhof, T. C., de Camilli, P., Niemann, H., and Jahn, R., 1993: Membrane fusion machinery: insights from synaptic proteins. *Cell* 75: 1-4
- Südhof, T. C., 1995: The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375: 645-653
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brünger, A. T., 1998: Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395: 347-353
- Tang, B.L., Tan, A.E.H., Lim, L.K., Lee, S.S., Low, D.Y.H., Hong, W., 1998: Syntaxin 12, a member of the syntaxin family localized to the endosome. *J. Biol. Chem.* 273, 6944-6950
- Terrian, D. M., and White, M. K., 1997: Phylogenetic analysis of membrane trafficking proteins – a family reunion and secondary structure predictions. *Eur. J. Cell Biol.* 73: 198-204
- Ungermann, C., Sato, K., and Wickner, W., 1998: Defining the functions of trans-SNARE pairs. *Nature* 396: 543-548

- Walch-Solimena, C., Blasi, J., Edelmann, L., Chapman, E. R., Fischer von Mollard, G., and Jahn, R., 1995: The t-SNAREs syntaxin 1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling. *J. Cell Biol.* 128: 637-645
- Ward, D., Pevsner, J., Scullion, M.A., Vaughn, M. and Kaplan, J., 2000: Syntaxin 7 and VAMP7 are SNAREs required for late endosome-lysosome and homotypic lysosome fusion in alveolar macrophages. *Mol. Biol. Cell* 11: 2327-2333
- Waters, M. G., and Hughson, F. M., 2000: Membrane tethering and fusion in the secretory and endocytic pathways. *Traffic* 1: 588-597
- Weimbs, T., Low, S. H., Chapin, S. J., Mostov, K. E., Bucher, P., and Hofmann, K., 1997: A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3046-3051
- Weimbs, T., Mostov, K. E., Low, S. H., and Hofmann, K., 1998: A model for structural similarity between different SNARE complexes based on sequence relationships. *Trends Cell Biol.* 8: 260-262
- Wendler, F., Page, L., Urbe, S. and Tooze, S.A., 2000: Homotypic fusion of immature secretory granules during maturation requires syntaxin 6. *Mol. Biol. Cell* 12: 1699-1709
- Xu, Y., Wong, S. H., Tang, B. L., Subramaniam, V. N., Zhang, T., and Hong, W., 1998: A 29-kilodalton Golgi soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (Vti1-rp2) implicated in protein trafficking in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 273: 21783-21789
- Xu, T., Rammner, B., Margittai, M., Artalejo, A. R., Neher, E., and Jahn, R., 1999: Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. *Cell* 99: 713-722

Xu, D., Joglekar, A.P., Williams, A.L. and Hay, J.C., 2000: Subunit structure of a mammalian ER/Golgi SNARE complex. *J. Biol. Chem.* 275(50): 39631-39639

Yang, B., Gonzalez, L., Prekeris, R., Steegmaier, M., Advani, R.J., and Scheller, R.H. 1999: SNARE interactions are not selective – implications for membrane fusion specificity. *J. Biol. Chem.* 274, 5649-5653

Publikation:

Kreykenbohm, V., Wenzel, D., Antonin, W., Atlachkine, V., Fischer von Mollard, G.,
2002: The SNAREs vti1a and vti1b have distinct localization and SNARE complex
partners. *Eur. J. Cell. Biol.*, 81 : 273-280

Danksagung:

Herrn Prof. Dr. Kurt von Figura möchte ich dafür danken, dass ich diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen konnte und Herrn Prof. Dr. Gerhard Gottschalk dafür, dass er das Korreferat übernahm.

Dr. Gabriele Fischer von Mollard danke ich für die wissenschaftliche Betreuung und dafür, dass sie sich immer Zeit nahm, wenn ein Problem auftauchte.

Beate Veith danke ich für die Entwicklung eines Western Blots in letzter Minute und natürlich für die schöne Zeit, die wir im Labor hatten.

Dr. Vadim Atlachkine, Subbulakshmi Chidambaram und Namita Kanvar gebührt Dank für eine tolle Arbeitsatmosphäre und für ihre Hilfe in so vielen Dingen.

Anna Boulankina, sowie Dr. Stefan Hönig danke ich für ihre geduldige Hilfe bei der Bedienung des Mikroskops.

Dorothea Schierding lieb mir immer den Cellcracker, wenn ich ihn brauchte und half bei vielen Problemen, das Endosomenfusionsassay betreffend. Dafür möchte ich ihr herzlich danken.

Sehr vermissen werde ich die Rauchpausen mit Olaf Bernhard, der immer ein offenes Ohr für mich hatte! Und die Essenspausen mit Kerstin und Kathrin Jürgens, Yvonne Cornesse, Tiemo Klisch, Constanze Riel, Anna Boulankina, Meik Dilcher und allen anderen, die ich nicht vergessen habe, aber nicht alle erwähnen kann.

Dr. Meik Dilcher war buchstäblich in den letzten Stunden die allergrösste Hilfe. Ich wünsche mir sehr, dass ich ihm diesen nicht selbstverständlichen freundschaftlichen Gefallen eines Tages auch in irgendeiner Weise tun kann. Als er unsere Arbeitsgruppe verliess entstand ein grosses Loch, nicht nur weil er auch an die höchsten Regale reichen konnte. Stimmts Meiki?

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern dieses Institutes für die nette Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken.

Ohne die Unterstützung meiner Eltern, in finanzieller und noch wichtiger in moralischer Hinsicht, gäbe es diese Arbeit nicht. Ich bin ihnen, meiner Schwester und meinen Freunden aus tiefster Seele dankbar. Einfach nur dafür, dass es sie alle gibt!

Lebenslauf:

Name:	Vera Kreykenbohm
Geburtsdatum:	09.07.1972
Geburtsort:	Seesen
Staatsangehörigkeit:	deutsch
1978 – 1982	Grundschule in Bad Grund
1982 – 1984	Orientierungsstufe Am Johannisborn in Badenhausen
1984 – 1991	Gymnasium Robert Koch Schule in Clausthal-Zellerfeld
November 1993	Beginn des Studiums der Biologie (Diplom) an der Georg-August Universität in Göttingen
Juli 1996	Diplomvorprüfung in den Fächern Zoologie, Botanik, Anorganische Chemie, Physik
SS 1999	mündliche Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Zoologie und Geologie
November 1999 – Februar 2001	Diplomarbeit mit dem Thema „Vti1a – Lokalisation und SNARE-Partner“ in der Abteilung von Prof. Dr. K. von Figura im Zentrum für Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Georg-August-Universität unter der Anleitung von Frau Dr. Gabriele Fischer von Mollard
März 2001	Biologie-Diplom
April 2001 – September 2004	Anfertigung der vorliegenden Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung der endosomalen Qb-SNAREs Vti1a und Vti1b“ in der Abteilung von Prof. Dr. K. von Figura im Zentrum für Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Georg-August-Universität unter der Anleitung von Frau Dr. Gabriele Fischer von Mollard